

NOTE TO USERS

Page(s) missing in number only; text follows. Page(s) were scanned as received.

105-110 & 166-173

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DE SERPINES
MODIFIÉES CIBLANT LA FURINE**

par

ERICK DUFOUR

Département de pharmacologie

**Thèse présentée à la faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
docteur ès sciences (Ph.D.)**

Octobre 2004

*Les pages suivantes
sont manquantes :
105 à 110
112 à 120
166 à 173
175 à 181
et p. 164
Mais document correct
tel quel.*



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-00195-X

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-00195-X

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES PUBLICATIONS	v
LISTE DES RÉSUMÉS DE COMMUNICATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION	1
1.1. LA SUPERFAMILLE DES SERPINES	1
1.1.1. Introduction sur la superfamille des serpines	1
1.1.2. Nomenclature de la superfamille des serpines	5
1.1.3. Répartition et présence des serpines chez les organismes vivants	6
1.1.4. Fonctions biologiques des serpines	7
1.1.5. Structures d'une serpine	11
1.1.6. L'état natif d'une serpine	15
1.1.7. Les changements de conformation d'une serpine	17
1.1.8. La métastabilité et le repliement d'une serpine	20
1.1.9. Mécanisme d'inhibition des serpines	21
1.1.9.1. Le mécanisme d'inhibition de la voie fourchée d'une serpine et la stœchiométrie d'inhibition (SI)	22
1.1.9.2. Le complexe initial non covalent de type Michaelis	29

1.1.9.3. Le complexe covalent	30
1.1.9.4. L'exigence pour une insertion rapide de la boucle	36
1.1.9.5. L'importance de la composition de la boucle du site réactif	38
1.1.9.6. L'importance de la longueur de la boucle du site réactif	41
1.1.9.7. La cinétique et la thermodynamique de la formation du complexe final	42
1.1.9.8. Stabilité du complexe covalent	46
1.1.9.9. La protéolyse de la protéinase à l'intérieur du complexe covalent	50
1.1.9.10. Les concepts de l'efficacité d'inhibition et la spécificité des serpins	51
1.2. FAMILLE DES CONVERTASES DE MAMMIFÈRE DE TYPE SUBTILISINE/KEXINE	53
1.2.1. Fonction biochimique de la maturation protéolytique cellulaire	53
1.2.2. Découvertes de la première convertase de mammifère : l'origine de SPC1/furine	56
1.2.3. Les propriétés biochimiques de SPC1/furine	61
1.2.4. Rôles physiologiques et pathophysiologiques de SPC1/furine	78
1.2.5. Cristallisation du domaine catalytique-domaine P de la furine	89
1.3. RATIONNELLE DE L'ÉTUDE	101

RÉSULTATS

1^{er} article : Propriétés de type serpine de l' α_1 -antitrypsine Portland envers la
convertase furine 104

2^{ième} article : Contribution des résidus arginines à l'intérieur de la région P6-P1 de
l' α_1 -antitrypsine en réaction avec la furine 111

3^{ième} article : Stabilité des complexes serpinines variantes-furine : dépendance au pH
et régulation de l'étape de déacylation 121

4^{ième} article : Thérapie de l'inhibition de l'élastase chez la fibrose kystique : rôle
de la glycosylation sur la distribution de l'alpha-1 inhibiteur de protéase dans le sang
versus le poumon. 165

5^{ième} : Conjugaison du polyéthylène à la Cys232 prolonge la demie-vie de l'alpha-
1 inhibiteur de protéase. 174

DISCUSSION 182

CONCLUSION 206

BIBLIOGRAPHIE 213

LISTE DES PUBLICATIONS

Dufour, Erick K., Denault, Jean-Bernard, Hopkins, Paul C.R. & Leduc, Richard. (1998). Serpin-like properties of α_1 -antitrypsin Portland towards furin convertase. *FEBS Lett.* 426:41-46.

Rodriguez-Manzanegue, Juan Carlos, Milchanowski, Allison B., Dufour, Erick K., Leduc, Richard & Iruela-Arispe, Luisa (2000). Characterization of METH-1/ADAMTS-1 processing reveals two distinct active forms. *J. Biol. Chem.* 275: 33471-33479.

Dufour, Erick K., Denault, Jean-Bernard, Bissonnette, Lyne, Hopkins, Paul C.R., Lavigne, Pierre & Leduc, Richard (2001). The contribution of arginine residues within the P6-P1 region of alpha 1-antitrypsin to its reaction with furin. *J Biol Chem.* 276:38971-9.

Cantin, André M., Woods, Donald E., Cloutier, Diane, Héroux, Julie, Dufour, Erick K. & Leduc, Richard (2002). Leukocyte elastase inhibition therapy in cystic fibrosis: role of glycosylation on the distribution of alpha-1-proteinase inhibitor in blood versus lung. *J Aerosol Med* 15(2):141-8.

Cantin, André M., Woods, Donald E., Cloutier, Diane, Dufour, Erick K. & Leduc Richard (2002). Polyethylene glycol conjugation at Cys²³² prolongs the half-life of alpha1-proteinase inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(6):659-65.

LISTE DES RÉSUMÉS DE COMMUNICATION

Boucard, Antony, Denault, Jean-Bernard, Dufour, Erick K. et Leduc, Richard. Inhibition de la furine par des mutants de l' α_1 -antitrypsine. *Colloque des étudiants de premier cycle de biochimie*, Mars 1997.

Dufour, Erick K., Denault, Jean-Bernard et Leduc, Richard. Caractérisation de l'inhibition de la furine par des mutants de l' α_1 -antitrypsine. *Club de Recherches Cliniques du Québec*, Octobre 1997.

Dufour, Erick K., Leduc, Richard et Cantin, André. Important consideration in the choice of recombinant technology to produce α_1 -proteinase inhibitor for therapy in patients with cystic fibrosis. *CBDN*, May 1999.

Denault, Jean-Bernard, Dufour, Erick K., et Leduc, Richard. High-level expression of the mammalian subtilisin-like proprotein convertase hSPC1 in *Drosophila* S2 cells. *Current Topics in Gene Expression Systems*, Juin 1999.

Leduc, Richard, Denault, Jean-Bernard, Bissonnette, Lyne, et Dufour, Erick K. The contribution of arginine residues within the P6-P1 region of α_1 -antitrypsin to its reaction with SPC1/furin. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology & the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Juin 2000.

Dufour, Erick K., Denault, Jean-Bernard, Bissonnette, Lyne, et Leduc, Richard. Mechanism of hSPC1/furin inhibition by α_1 -antitrypsin reactive site loop mutants. *International Symposium on Proteases*. Juin 2000.

Dufour, Erick K., Denault, Jean-Bernard, Bissonnette, Lyne, et Leduc, Richard. Modulation de l'activité protéolytique de hSPC1 par des variants de l'antitrypsine. *Club de Recherches Cliniques du Québec*, Septembre 2000.

Héroux, Julie, Dufour, Erick K., Leduc, Richard, et Cantin, André M.. Active recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor synthesis in an oxidative cytoplasmic environment. *ATS*, Mai 2001.

Cantin, André, Cloutier, Diane, Héroux, Julie, Dufour, Erick K., Woods, Donald E. et Leduc, Richard. Therapeutic potential of site-specific thiol-modified α_1 -antitrypsin. *North American CF conference*, Octobre 2001.

Dufour, Erick K., Bisaillon, Lyne et Leduc, Richard. Inhibitory properties of serpinA1 and serpinA3 variants towards the proprotein converting enzyme furin. *Symposium on Serpin Biology, Structure and Function*, Juin 2002.

Cantin, André, Bilodeau, Ginette, Dufour, Erick K., et Leduc, Richard. The convertase inhibitor Decanoyl RVKR-cmk inhibits TGF- β release from the alveolar cell line A549. *ATS 2004, 100th International Conference*.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Clans des serpins.	8
TABLEAU 2 : Séquences de la boucle du site réactif pour les serpins humaines inhibitrices et non inhibitrices.	40
TABLEAU 3 : Famille des convertases de proprotéines de type subtilisine/kexine.	60

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Illustration des différents éléments de structure d'une serpine typique.	3
FIGURE 2 : Fonctions biologiques des serpins humaines.	9
FIGURE 3 : Comparaison des différents états conformationnels ouverts aux serpins.	12
FIGURE 4 : Mécanisme de la voie fourchée des serpins comme des inhibiteurs de substrat suicide.	25
FIGURE 5 : Comparaison des structures du complexe covalent entre l' α 1-antitrypsine et la trypsine déterminé par deux méthodes d'analyse.	33
FIGURE 6 : Diagramme schématique d'énergie pour le mécanisme de couplage entre le transfert d'énergie dérivée par l'insertion de la boucle et l'ouverture et fermeture de l'hélice F pour emprisonner la protéinase désactivée dans un complexe stable.	45
FIGURE 7 : Schématique des structures impliquées dans le diagramme d'énergie de la figure 6.	47
FIGURE 8 : Diagramme schématique de la famille des convertases de proprotéines de type subtilisine (PC).	58

FIGURE 9 : Les compartiments de maturation par la furine du réseau <i>trans</i> -Golgi (TGN)/système endosomal.	69
FIGURE 10 : La voie d'autoactivation de la furine.	73
FIGURE 11 : Modèle de la circulation de la furine dans la cellule.	76
FIGURE 12 : Les motifs de sortie du domaine cytoplasmique de la furine.	79
FIGURE 13 : La furine dans le développement, l'homéostasie et la maladie.	81
FIGURE 14 : L'activation par la furine de la toxine d'anthrax.	84
FIGURE 15 : La structure générale tridimensionnelle de la furine de souris.	91
FIGURE 16 : Structure primaire de la furine de souris.	94
FIGURE 17 : Les interactions entre l'inhibiteur et la fente du site actif.	98
FIGURE 18 : Un modèle de l'interaction du substrat avec la furine.	100

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α_1 -AT ou α_1 -AT-WT: α_1 -antitrypsine de type sauvage

α_1 -ACT ou α_1 -ACT-WT : α_1 -antichymotrypsine de type sauvage

AP: protéine adaptatrice

ATh: antithrombine

BFA: bréfeldine

BPTI: Inhibiteur de protéase de type trypsine bovine

CK2: caséine kinase 2

CrmA: cytokine response modifier A du virus cowpox

FRET: transfert d'énergie de résonance par fluorescence

HA: hémagglutinine du virus influenza aviaire

HCII: heparine cofactor II ou cofacteur de l'héparine de type II

HNE : élastase neutrophilique humaine

ISG : granules sécrétoires immatures

Kex2 : la kexine de la levure

MSG : granules sécrétoires matures

Ov : ovalbumine

PA: antigène protecteur de l'anthrax

PACS : protéine de sortie du groupe acide phosphofurine

PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1 ou inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1

PAI-2: plasminogen activator inhibitor-2 ou inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 2

PC : convertase de proprotéine de mammifère

PEDF: pigment epithelium-derived factor ou facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire

PP2A: protéine phosphatase 2A

RE: réticulum endoplasmique

RSL : « reactive site loop », en français pour boucle du site réactif

SDS : dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS

SI : stœchiométrie d'inhibition

SBTI : inhibiteur de la trypsine provenant des graines de soya

tPA : activateur du plasminogène de type tissulaire

TGN : réseau du *trans*-Golgi

uPA : activateur du plasminogène de type urokinase

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DE SERPINES
MODIFIÉES CIBLANT LA FURINE ET L'ÉLASTASE

Par

Erick Dufour

Département de pharmacologie

Thèse présenté à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
Philosophia doctor (Ph. D.)

RÉSUMÉ

L' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT), un inhibiteur naturel de l'élastase, et l' α_1 -antichymotrypsine (α_1 -ACT) appartiennent à la superfamille des serpins, qui sont des inhibiteurs irréversibles de sérines protéinases. Nous avons développé une approche qui consiste à modifier la boucle du site réactif de ces serpins afin de cibler diverses sérines protéinases impliquées dans le clivage de précurseurs protéiques (furine) ou de protéines de la matrice extracellulaires (élastase). La furine est une sérine protéinase Ca^{2+} -dépendante appartenant à la famille des convertases de mammifères de type subtilisine/kexine. Elle réside principalement dans le réseau du *trans*-Golgi (TGN) de la voie de sécrétion constitutive, mais elle peut aussi se retrouver à la surface cellulaire. À partir de la spécificité de la furine qui reconnaît principalement des paires ou plusieurs acides aminés basiques d'une séquence donnée, nous avons construit une série de variants d' α_1 -AT et d' α_1 -ACT contenant différents motifs de reconnaissance pour la furine afin d'augmenter l'affinité et leur pouvoir inhibiteur envers cette convertase. De plus, nous avons aussi développé une méthode qui consiste à conjuguer chimiquement sur une cystéine de l' α_1 -AT recombinante un polyéthylène glycol (PEG) afin d'augmenter sa stabilité lors des études *in vivo*.

Les résultats montrent que la boucle du site réactif de l' α_1 -AT peut être aisément modifiée en un inhibiteur irréversible de la furine, comme l' α_1 -AT-PDX, sans compromettre les propriétés inhibitrices essentielles de la serpine originale. Les divers variants de la boucle du site réactif de l' α_1 -AT et l' α_1 -ACT ont montré tous une capacité de former des complexes SDS-stables avec des stœchiométries d'inhibitions (SI) variables *in vitro* et d'abolir la maturation protéolytique du précurseur du facteur von Willebrand par la furine *in cellulo*. Toutefois, l'insertion de résidus basiques dans la région réactive de l' α_1 -AT et l' α_1 -ACT à des positions stratégiques a affecté l'ensemble des propriétés inhibiteurs de type serpine de certains variants. La reconnaissance de motifs canoniques furine (e.g. RXXR) par la furine est pH indépendante, alors que l'étape de déacylation est dépendante du pH, comme montré par AT-EK2. Par contre, les variants α_1 -ACT sont plus efficaces à former un complexe à pH acide alors que les variants α_1 -AT le sont à pH basiques. De plus, la conjugaison au PEG de l' α_1 -AT recombinante a permis de prolonger sa demie-vie dans le poumon et le sang et de contrecarrer les effets hémorragiques causés par l'élastase leucocytaire dans le poumon des souris.

Étant donné que la furine est responsable de l'activation de plusieurs précurseurs protéiques bactériens, tel que l'anthrax, et les glycoprotéines virales, tel que le virus d'Ebola, ces inhibiteurs anti-furine contenant des séquences de résidus basiques déterminées pourraient potentiellement être utilisés pour combattre ces infections pathogènes. De plus, ils permettraient de contrecarrer l'acuité des effets de morbidité causés par des pathogènes opportunistes dans certaines maladies du système respiratoire (emphysème et fibrose kystique).

INTRODUCTION

1.1. LA SUPERFAMILLE DES SERPINES

1.1.1. Introduction sur la superfamille des serpines

L'introduction sur cette superfamille de protéines permettra au lecteur de bien comprendre les nombreuses facettes moléculaires, biochimiques, biologiques et physiologiques de cette fascinante classe de protéines comprenant une multitude de fonctions. Cependant, je porterai une plus grande attention sur les aspects inhibiteurs envers les protéinases qui caractérisent principalement les serpines inhibitrices.

Le nom serpine (en anglais « serpin » pour *serine* protéinase inhibitor) dérive, principalement, du fait que plusieurs membres de cette superfamille de protéines sont des inhibiteurs de sérines protéinases, avec un mécanisme unique d'action. La constitution et l'appartenance à cette superfamille de protéines sont basées sur la présence d'un domaine central unique, commun à toutes les serpines, constitué de trois feuillets β et de 8-9 hélices α . La présence de ce domaine central confère, à cette superfamille, une série de propriétés structurelles et fonctionnelles très exceptionnelles (Figure 1). L'identification initiale de la superfamille fut basée sur une observation de similarités de structure primaire entre trois protéines : l'antithrombine humaine, l'antitrypsine humaine et l'ovalbumine du blanc d'œuf de poulet (Hunt et Dayhoff, 1980). Cette similarité de structure primaire a permis d'établir distinctement une relation entre ces trois protéines, malgré leurs identités de séquence d'environ de 30% et de leurs fonctions biologiques

très différentes, où les deux premières appartiennent aux groupes d'inhibiteurs de sérine protéinases et la dernière est une protéine de réserve abondante dans le blanc d'œuf, sans activité inhibitrice (Wright, 1984). À partir de la détermination de plusieurs structures cristallines de serpins connues, il fut démontré que la similitude de la structure primaire autour d'une région est approximativement de 350 résidus correspondant à un domaine structural tertiaire conservé. Quoique cette structure tertiaire centrale autour de 350 résidus est présente dans toutes les serpins, il y a quelques légères modifications mineures structurales entre les diverses serpins causées par des insertions et des délétions qui peuvent introduire ou enlever des boucles, allonger ou raccourcir des hélices α . La taille en acides aminés varie considérablement parmi les différentes serpins ce qui résultent, en fait, par des extensions en N- et en C-terminal de la protéine. Certaines serpins sont glycosylées au niveau du groupement amino (N) du radical d'une Asn et/ou du groupement hydroxyle (O) du radical d'une Ser ou une Thr. La majorité des serpins ont un poids moléculaire qui varient entre 40 à 60 kDa. En utilisant la séquence protéique de l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT), un inhibiteur protéique retrouvé dans le sang et naturel de l'élastase neutrophilique comme point de référence pour une recherche dans une banque de données qui contient toutes les séquences protéiques disponibles, on a la possibilité d'identifier à peu près > 400 serpins à partir de tous les organismes (Irving et al., 2000). Depuis que la séquence complète du génome humain ainsi que la séquence du génome d'autres organismes sont connues, il est probable qu'un nombre grandissant de serpins sera identifiées dans un avenir plus ou moins rapproché. Malgré la présence d'un repliement structurel protéique commun à toutes les serpins, la comparaison séquentielle

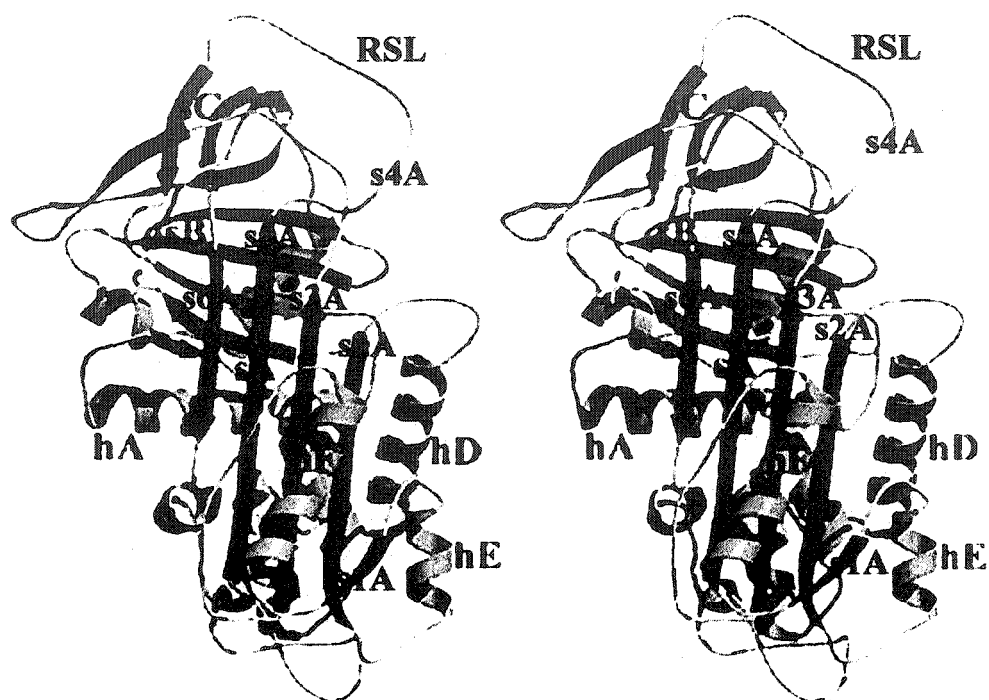
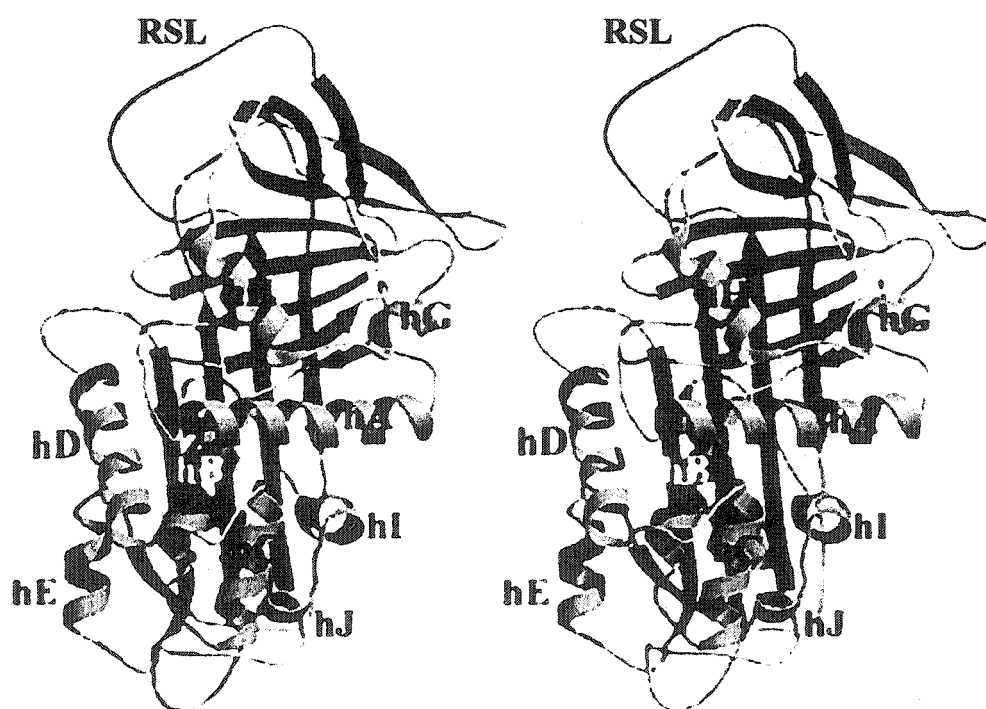
Devant**Arrière**

Figure 1: Vus en stéréo de devant et de d'arrière d'une serpine typique (ici α_1 -antitrypsine provient de la structure d'Elliott et al., 1998) pour illustrer les caractéristiques structuraux secondaires notables et la location de la boucle du site réactif. Les feuillets β A, B et C sont représentés en rouge, bleu et vert, respectivement. Les huit hélices α sont désignées et marquées de A à H. Les cinq brins composant le feuillet β sont nommés et marqués de s1A, s2A, s3A, s5A et s6A. La boucle du site réactif (RSL) est indiquée au-dessus de la molécule et montrée en jaune et aussi le brin s4A, à la suite d'un clivage par une protéinase.

de l'identité protéique de la structure primaire entre chacune peut être aussi basse que 25%.

1.1.2. Nomenclature de la superfamille des serpins

L'origine de la création du mot serpine provient a priori principalement du fait que la plupart des serpins furent identifiées comme des inhibiteurs de sérines protéinases (Carrell et Travis, 1985). Cependant, au même moment de la caractérisation de cette nouvelle famille de protéine dans les années 80, il était déjà connu que certains membres, avant d'être attribués à une superfamille de protéines avec diverses fonctions biologiques (voir à la section 1.1.4.), ne possédaient aucune propriété inhibitrice envers des protéinases, comme l'angiotensinogène (précurseur de l'angiotensine II, une hormone vasopresseur) (Doolittle, 1983) et l'ovalbumine (Hunt et Dayhoff, 1980). Depuis lors, la superfamille de serpins voit son nombre de serpins identifiées n'ayant aucune fonction inhibitrice augmenté considérablement, avec en plus des serpins qui inhibent des cystéines protéinases. Les serpins nouvellement identifiées apportent alors de nouveaux attributs biochimiques et biologiques insoupçonnés jusqu'à maintenant. Bien que l'acronyme serpine décrivait, au début de leur découverte, l'appartenance de ces protéines à une famille ayant des propriétés fonctionnelles principalement d'inhibition, cette nomenclature est devenue clairement inappropriée et caduque, à cause des nouvelles fonctions biochimiques et biologiques des serpins (voir la section 1.1.4.). Il fut demandé à un comité, mandaté par le HUGO Gene Nomenclature Committee, de restructurer la classification des membres de cette superfamille de protéine. Il fut établi que le nom

serpine restera en se référant fondamentalement aux caractéristiques structurales de la superfamille. Le nom de chaque membre de cette classification sera désigné par la rétention du nom de la superfamille accompagné d'une lettre représentant un clan, selon son appartenance phylogénétique (Silverman et al., 2001) (Tableau 1).

1.1.3. Répartition et présence des serpins chez les organismes vivants

Les serpins sont très fortement distribués parmi les eucaryotes et, aussi, parmi certains virus qui les infectent. Elles sont absentes chez les champignons et chez les chlorophylles, même si, toutefois, elles sont retrouvées chez les plantes supérieures (Irving et al., 2000). Récemment, Il a eu la parution du premier rapport sur l'existence de serpins chez les procaryotes (Irving et al., 2002). Plusieurs serpins chez les organismes multicellulaires sont extracellulaires, par contre, il y en a d'autres qui sont intracellulaires (comme la sous-famille ov-serpins du clan B (Remold-O'Donnell, E., 1993)). Certaines serpins peuvent être localisées dans les deux compartiments extra- et intracellulaires (Belin et al., 1989; Mikus et al., 1993). Celles qui sont intracellulaires se retrouvent surtout à l'intérieur du cytoplasme, quoique, maintenant, certaines études rapportent la présence de serpins intracellulaires pouvant se retrouver à l'intérieur du compartiment nucléaire (Grigoryev et al., 1999), où leur localisation cellulaire et leur expression est dépendante du type de cellule.

Les serpins sont présentes aussi chez les autres mammifères, les plantes, les virus, la drosophile et d'autres arthropodes (insectes), les nématodes, les parasites, les oiseaux, les poissons, les amphibiens et les reptiles.

1.1.4. Fonctions biologiques des serpins

La figure 2 illustre seulement les différentes fonctions biologiques que qu'accomplissent les serpins dans l'homéostasie du corps humain. Plusieurs serpins ont une fonction directe d'inhibition envers une protéinase spécifique dans un processus physiologique donné. Par contre, d'autres possèdent plutôt un autre type d'activité biologique, comme le transport d'une hormone dans la circulation sanguine. Cependant, pour certaines, leurs rôles dans le processus biologique ne sont pas encore très bien définis. L'introduction de cette thèse traitera uniquement des caractéristiques biochimiques du mécanisme d'inhibition des serpins. En outre, cette section voulait présenter sommairement que ces protéines avaient une multitude de fonctions biologiques à l'intérieur de l'organisme, autre que la fonction d'inhibiteur. Malgré leur similarité structurale entre elles, cette structure tertiaire leur offre une grande liberté de possibilité de fonction.

Tableau 1. Clans des serpines^a

Nom des clans	Lettre
α_1 -proteinase inhibitor	A
intracellular, ov-serpin	B
antithrombin	C
heparin cofactor II	D
proteinase nexin, PAI-1	E
α_2 -antiplasmin, PEDF	F
C1 inhibitor	G
HSP47	H
neuroserpin	I
horseshoe crab	J
insect	K
nematode	L
blood fluke	M
viral SPI1-2/CrmA-like	N
viral SPI3-like	O
plant	P
unclassified (orphans)	

^a From refs 4 and 7.

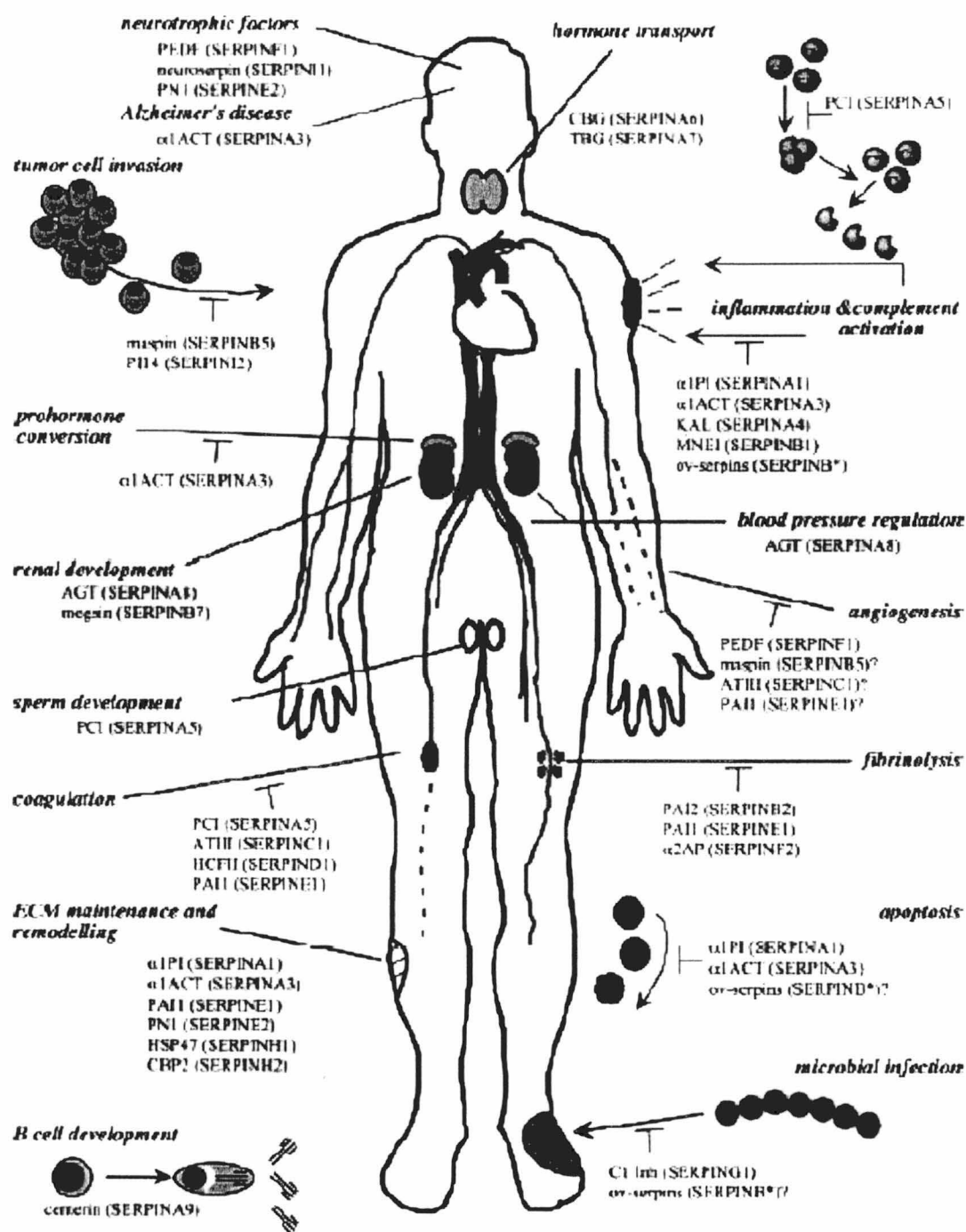


Figure 2 : Fonctions biologiques des serpinines humaines. Les serpinines humaines sont impliquées dans une diversité de fonctions biologiques (*italiques*). Pour certaines serpinines (en rouge), leurs fonctions biologiques apparaissent d'être liées directement à l'inhibition des protéinases. Pour les autres (en vert), leur activité ne requiert pas l'inhibition des protéinases, ou leur rôle dans les événements biologiques n'ont pas été définis.

1.1.5. Structures d'une serpine

Des études récentes de structure aux rayons X de diverses serpines dans différentes formes complexées et non complexées ont permis d'acquérir et d'approfondir rapidement de nouvelles informations sur la nature structurale d'une serpine typique. Cependant, un grand nombre d'études de structure furent portées surtout sur les formes non-complexées de diverses serpines. Les formes structurales non complexées des serpines permettent d'illustrer les caractéristiques communes de repliement d'une serpine typique et aussi les types de changements conformationnels que l'on peut rencontrer avec ce genre de structure tertiaire (Figure 3). Ces changements structuraux que subissent les serpines sont très essentiels à leur fonctionnement correct et unique comme inhibiteurs de protéinases. Toutefois, l'information structurale concernant les complexes des serpines-protéinases est plutôt limitée actuellement. Cette section met en perspective un bref aperçu de l'historique des différentes structures possibles d'une serpine, découverte par rayons X.

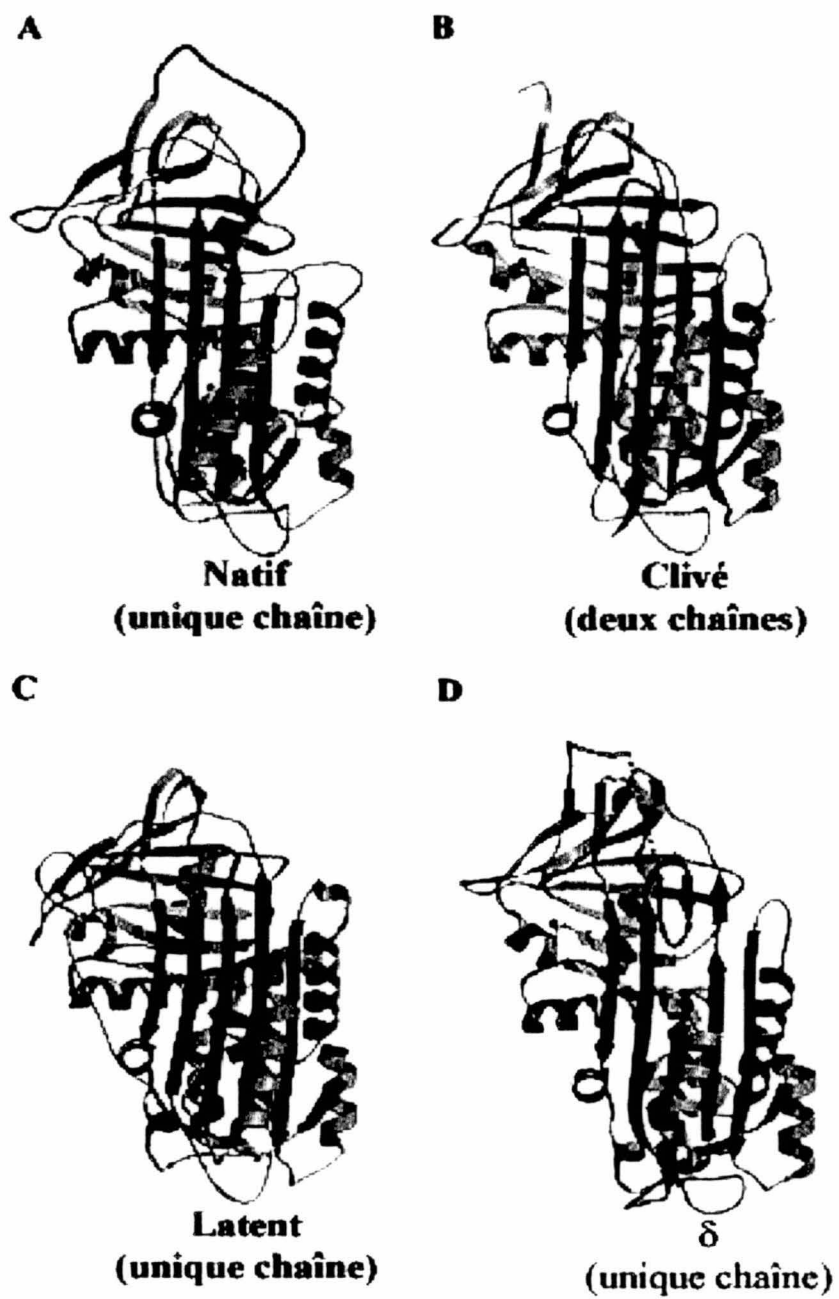


Figure 3 : Comparaison des différents états conformationnels ouverts aux serpins. (A) État natif de l' α_1 -antitrypsine (Elliott et al., 1998; pdb 1QLP), (B) état clivé de l' α_1 -antitrypsine (Löbermann et al., 1989; pdb 7API), (C) état latent de PAI-1 (Tucker et al., 1995; pdb 1C5G) et (D) la conformation δ d'un variant de l' α_1 -antichymotrypsine (Gooptu et al., 2000; pdb 1QMN). Pour souligner les changements majeurs dans sa location, la boucle du site réactif est montrée en bleu et le reste du feuillet β A est en rouge.

La toute première structure d'une serpine fut obtenue en 1984, mais sous une forme clivée de l' α_1 -AT humaine (Löbermann, H. et al., 1984). Il fut surprenant d'obtenir une structure clivée de l' α_1 -AT, étant donné que l' α_1 -AT était dans son état natif et active en présence du zymogène de la chymotrypsine pour accomplir la cristallisation. Ceci dans le but de tenter de cristalliser un complexe de la serpine avec une protéinase donnée. Cependant, le résultat final de la structure cristallisée fut uniquement la présence de l' α_1 -AT, dans sa forme inactive, dans laquelle la boucle du site réactif (RSL, pour « reactive site loop ») fut clivée. Le plus surprenant de cette découverte fut que le RSL, localisé au-dessus du corps central de la serpine native afin d'être exposé à la vue de la protéinase, n'était plus exposé à l'endroit initial. Par contre, le RSL fut plutôt intégré dans le feuillet β A, (une unité structurale secondaire importante du corps de la serpine et un des plus larges parmi les feuillet β), comme le quatrième brin de cette structure. Globalement, la serpine a réagit au contact de trace de protéinases actives afin de donner, comme nous le connaissons maintenant, un complexe serpine-protéinase covalent. Par la suite, avec le temps, ce complexe s'est dissocié en donnant une serpine clivée qui fut, après, cristallisée. Il s'est passé six ans avant que la structure suivante ne fut déterminée, qui a été la forme native de la serpine ovalbumine, qualifiée non inhibitrice (Stein et al., 1990). Quelques temps après, la structure d'une des formes de l'ovalbumine dans laquelle le RSL est clivé fut résolue. Cette étude montrait une différence fondamentale entre la forme clivée du RSL d'une serpine inhibitrice, l' α_1 -AT, et d'une serpine non inhibitrice, l'ovalbumine dans laquelle le RSL clivé de cette dernière ne fut pas inséré à l'intérieur de son feuillet β A (Wright et al., 1990). Ces nouvelles connaissances ont permis de

suggérer une différence fondamentale dans le comportement des serpins inhibitrices et non-inhibitrices et de fournir une relation entre le changement conformationnel chez les serpins et leur habilité d'inhiber les protéinases. La prochaine structure découverte fut celle de la forme latente du « plasminogen activator inhibitor-1 » (PAI-1) (Figure 3C) (Mottonen et al., 1992) qui montrait une autre variation de la structure de base d'une serpine typique, où la localisation du RSL dans cette forme est simplement, dans une chaîne polypeptidique unique, la même que la forme clivée de l' α_1 -AT, mais dans laquelle la partie non insérée de la boucle est composée des résidus qui auraient été autrement le brin 1 du feuillet β C dans la forme clivée. Ces résidus sont alors éloignés de cet endroit dans le but de fournir un « retour » au-dessus de la molécule. En 1994, les premières structures des formes non clivées des serpins inhibitrices furent rapportées : l'antithrombine (ATh) (Schreuder et al., 1994; Carrell et al, 1994) et un variant de l' α_1 -antichymotrypsine (α_1 -ACT) (Wei et al., 1994). Depuis ce temps, plus de 30 structures de serpins non complexées additionnelles qui furent rapportées, pour un ensemble total de 12 serpins différentes.

1.1.6. L'état natif d'une serpine

Les structures secondaires et tertiaires de presque toutes les serpins présentent des similarités notables à l'intérieur du domaine central. La structure primaire de l' α_1 -AT et la localisation des différents éléments structuraux secondaires sont données à la Figure 1 comme la représentante de la superfamille des serpins. Le feuillet β A, un élément structural important, est le plus large des trois feuillets β (sA, sB et sC) qui composent le

corps de la serpine, et comprend cinq brins. Le premier (s1A) est un brin court de 5-6 résidus et les autres brins (s2A, s3A, s5A et s6A) sont plus longs avec des longueurs similaires (12-15 résidus) couvrant le long de l'axe vertical de la protéine. À part la relation entre les deux brins centraux (s3A et s5A) qui sont parallèles, le reste des brins du feuillet β A est antiparallèle. Cependant, l'insertion du RSL dans le feuillet β A entre les brins centraux parallèles (s3A et s5A) permet à cette structure d'acquérir une conformation antiparallèle. Par conséquent, la structure secondaire du feuillet β A devient entièrement antiparallèle sous sa forme clivée lors de l'insertion du RSL dans le corps de la serpine. Les feuillets β B et C sont plus courts et sont composés respectivement de six et quatre brins,. Il y a huit hélices α , qui sont désignées de A jusqu'à H. Relatif à la disposition du feuillet β A, toutes ces hélices, à l'exception de l'hélice F, se placent en arrière de la protéine, tel quel représenté à la Figure 3A. L'hélice F se place devant le feuillet β A et peut jouer un rôle sur la régulation de l'ouverture du feuillet β ou sur la stabilisation de l'élément structural à cinq brin (Yamasaki et al., 2002). Dans la forme native, le RSL, placé au-dessus du corps central tertiaire de la serpine et exposé au solvant, est attaché entre le C-terminal du brin s5A et le N-terminal du brin s1C. L'interface interne de cette boucle contient le lien peptidique réactif ($P_1-P'_1$) qui interagit avec le site actif des protéinases cibles. La longueur de la boucle peut avoir quelques petites variations entre les serpinés inhibitrices, particulièrement en N-terminal du lien peptidique réactif. Habituellement, la longueur du RSL est de 17 résidus, mais pour certaines serpinés elle est de 16 résidus. Par contre, en C-terminal, la longueur est moins contraignante et peut se trouver dans un écart de 5 à 9 résidus. La longueur de la boucle, en N-terminal du lien réactif, doit respecter des facteurs structurels stricts afin de ne pas

surpasser la barrière d'énergie qui pourrait empêcher le fonctionnement correct du mécanisme d'inhibition. La conformation du RSL peut être d'une grande variabilité, ce qui suggère que ce n'est pas une exigence structurale absolue pour la fonction d'inhibition. Dans le cas de l'ovalbumine native (première structure d'une serpine dans sa forme native qui a été résolue), son RSL est une hélice α bien définie de 3 tours (Stein et al., 1990). Pour un variant de l' α_1 -ACT recombinante, il est aussi dans une conformation hélicoïdale, mais plus près d'une hélice 3_{10} (Wei et al., 1994). Cependant, dans les autres structures de serpines, il fut trouvé que certains RSL n'avaient pas de structure secondaire régulière (Li et al., 1999) ou que certains RSL étaient dans une conformation β allongée (Elliott et al., 1996; Elliot et al., 1998; Kim et al., 2001). Néanmoins, le constat des différentes structures du RSL, étant donné que cette région est invariablement la plus exposée et est plus souvent impliquée dans les contacts protéine-protéine au niveau du cristal (Simonovic et al., 2001; Kim et al., 2001), il est possible que la cristallographie par rayons-X de cette région de la serpine ne donne pas une excellente représentation de son comportement réel en solution.

1.1.7. Les changements de conformation d'une serpine

La première structure de la forme clivée d'une serpine inhibitrice fut en premier déterminée pour l' α_1 -AT et par la suite pour les autres serpines. L'ensemble de ces structures recueillies ont montré la même ouverture remarquable du feuillet β A, lors du processus d'insertion du RSL clivée comme le quatrième brin du feuillet β , pour parachever le feuillet dans une structure complètement en brins antiparallèles. De plus,

l'environnement du RSL change radicalement lors de son insertion à l'intérieur du corps central de la serpine : au départ, le RSL est entièrement exposé aux molécules de solvant et, à la fin du processus, il finit enfoui dans un milieu hydrophobe de la molécule (Figure 3B). Dans cette structure finale obtenue (Figure 3B), le lien peptidique réactif (P_1 - P'_1) du RSL dans la forme native (Figure 3A), est séparé par une distance approximative de 70 Å de part et d'autre du lien réactif créant ainsi deux extrémités peptidiques (P_1 et P'_1), comme étant le résultat de l'insertion du RSL clivé. Le processus d'insertion de la boucle et de l'ouverture de la structure du feuillet β A provoque plusieurs petits changements additionnels au niveau de la structure, qui résultent principalement d'altérations dans l'empaquetage des hélices α sous-jacentes (Stein et Chothia, 1991). Ces altérations structurales sont un processus énergiquement favorable comme indiqué par le changement de la température de dénaturation d'une serpine native en comparaison à celle clivée. La plupart des serpines natives se dénaturent à $\sim 60^\circ\text{C}$, tandis que les serpines dans lesquelles le RSL est clivé et inséré se dénaturent à une température $> 120^\circ\text{C}$ (Kaslik et al., 1997). La détermination du ΔG° expérimental de ce processus n'est pas possible, puisque la transition de la forme native non clivée à la forme clivée est irréversible. Cependant, les mesures calorimétriques par la libération de chaleur ont permis de montrer une valeur très grande du ΔH° (~ 50 - 60 kcal mol^{-1}) lorsque le RSL d'une serpine est clivé et inséré à l'intérieur du feuillet β A (Boudier et Bieth, 2001).

Le troisième type de structure d'une serpine non complexée qui fut trouvé est une forme appelée latente. Cette forme latente fut d'abord trouvée chez PAI-1 (Mottonen et al., 1992) (Figure 3C) et, par la suite, retrouvée au niveau de la structure hétérodimérique de l'ATh (Carrell et al., 1994). On retrouve dans cette structure latente la même ouverture

équivalente du feuillet β A dans laquelle les serpine clivées subissent pendant l'insertion du RSL. La différence majeure par rapport à la forme clivée est le fait que le feuillet β C perd le premier brin (s1C), qui correspond aux résidus qui sont immédiatement en C-terminal du lien peptidique réactif, afin de fournir un segment peptidique entre le bas du feuillet β A et le haut du feuillet β B.

Finalement, le quatrième type de structure d'une serpine, appelée δ , fut obtenu avec un variant naturel de l' α_1 -ACT dans lequel le RSL fut partiellement inséré à l'intérieur du feuillet β A jusqu'au résidu P₁₂, à la place normalement occupée par les résidus P₁₀-P₃, car il fut envahi par les résidus provenant du dernier tour d'hélice de l'hélice F et de la boucle se connectant au brin s3A (Gooptu et al., 2000) (figure 3D). Cette insertion est plus importante que celle des résidus de la région charnière du RSL rencontrée dans la structure de l'ATh native, et moins que celle du PAI-1 sous sa forme latente. Il fut évident que, étant plutôt un phénomène de tout ou rien, l'insertion de la boucle peut s'accomplir par plusieurs intermédiaires définis, impliquant différentes longueurs d'insertion de la boucle.

Globalement, les quatre types de structure d'une serpine monomérique illustrent les différents types de changements conformationnels qui peuvent être présent au niveau du repliement d'une serpine. Ces différences viennent, en effet, des changements initiés par le RSL et de l'énergie thermodynamiquement favorable à l'insertion de cette boucle à l'intérieur du feuillet β A.

1.1.8. La métastabilité et le repliement d'une serpine

Reconnue implicitement, la forme de la chaîne polypeptidique unique d'une serpine peut exister dans une forme active normale dont la stabilité thermodynamique est inférieure qu'à la forme latente. La famille des serpins est une des rares familles de protéines qui se replient, sous sa forme native, dans un état métastable, i.e. dans un état d'énergie libre intermédiaire plus élevé que sous sa forme clivée (état d'énergie libre le plus bas). Cet état d'énergie est requis pour son activité biochimique et la nature du son mécanisme d'inhibition irréversible. Les serpins ont l'habilité à se renaturer spontanément, sans l'aide de ponts disulfures, à partir de corps d'inclusions solubilisés dans une solution de guanidium, dans un état métastable actif. Ceci indique que, peu importe la voie de renaturation, l'état métastable peut être l'un des états cinétiquement favorisés. Il y a peu d'études qui furent effectuées sur les mécanismes cinétiques de renaturation d'une serpine, si bien que les facteurs thermodynamiques impliqués qui assurent l'état métastable ne sont pas très compris, malgré sa renaturation plus rapide que la forme latente (Kim et Yu, 1996; Koloczec et al., 1996; Wang et al., 1996; Pearce et al., 2000). Puisque les différences majeures de la structure secondaire entre ces états impliquent directement le RSL, le feuillet β A et le feuillet β C, il est probable que le temps de formation et la stabilité d'un ou plusieurs de ces éléments structuraux peuvent être critiques sur la direction prise dans la voie de renaturation. Étant donné la variabilité de la structure secondaire apparente du RSL et l'absence habituelle d'interactions stabilisées à la fin de la renaturation complète, il semble plus probable que la formation des quatre brins du feuillet β C et/ou des cinq brins feuillet β A, plutôt que les six, sont

les facteurs principaux dans le repliement de la protéine que le RSL (Patston et Gettins, 1996). Puisque la structure du feuillet β A est sous la forme de six brins entièrement antiparallèles, tandis que sous la forme de cinq brins elle ne l'est pas, et étant donné que la formation de la forme de six brins, dans le cas des serpinines clivées, est très favorable, il est probable que la formation et la stabilisation préalable du feuillet β C orientent le processus de repliement en direction de l'état métastable. Pour éviter la conversion de la serpine sous sa forme latente (Lomas et al., 1995), une barrière d'énergie cinétique suffisamment grande apparaît à la fin du repliement moléculaire complet de plusieurs serpinines. Avec la même idée, il fut montré que l'introduction supplémentaire de 30 résidus dans le RSL de l' α_1 -AT contourne la barrière cinétique d'insertion ce qui a mené à la formation d'un état plus stable ce qui présume que l'insertion du RSL et la retenue du brin s1C du feuillet β C se sont présentées simultanément (Im et al., 2000). Quoique non clivée, la molécule qui en résulte possède une stabilité semblable à celle l' α_1 -AT-WT clivée lors d'une dénaturation au guanidinium.

1.1.9. Mécanisme d'inhibition des serpinines

Les particularités les plus remarquables du mécanisme d'inhibition des serpinines inhibitrices, pour désactiver la plupart des protéinases, sont : (i) un changement conformationnel radical à l'intérieur de la serpine, étant une partie essentielle dans la distorsion structurelle du site actif de la protéinase afin d'abolir son activité; (ii) la serpine piège la protéinase dans une trappe cinétique; (iii) le complexe serpine-protéinase formé est piégé dans une liaison de nature covalente et irréversible. Toutes ces

particularités contrastent fortement à celles retrouvées chez presque tous les autres classes d'inhibiteurs protéiques. Ces classes d'inhibiteurs utilisent plutôt une association non covalente «tight-binding» avec la protéinase, comme une serrure avec sa clé, accompagnée, parfois de petits changements conformationnels ou non dans l'un ou l'autre du complexe protéique, ce qui donne un complexe thermodynamiquement stable, mais réversible. Dans le cas des inhibiteurs de sérines protéinases de type non serpine, la nature de l'interaction est très bien comprise à cause de la détermination d'une panoplie de structures cristallines par rayons-X obtenues à partir d'un éventail de complexes protéinases-inhibiteurs, en plus des composantes protéiques individuelles (Bode et Huber, 1992). Par contre, pour le type d'interaction d'inhibition de type serpine, il y a très peu d'informations structurales, car présentement il existe seulement une seule structure cristalline par rayons-X du complexe covalent serpine-protéinase (Huntington et al., 2000) ainsi que des données limitées d'analyses spectroscopiques (RMN et fluorescence) sur des complexes similaires (Stratikos et Gettins, 1997; Mellet et al., 1998; Stratikos et Gettins, 1998; Stratikos et Gettins, 1999; Fa et al., 2000; Peterson et Gettins, 2001; Backovic et al., 2002).

1.1.9.1. Le mécanisme d'inhibition de la voie fourchée d'une serpine et la stœchiométrie d'inhibition (SI)

Le mécanisme de base, qui peut s'appliquer à toutes les réactions d'inhibition serpine-sérine protéinase, est un mécanisme d'inhibition du substrat suicide par une voie fourchée, résumé à la Figure 4. D'abord, la protéinase reconnaît le RSL exposé à la

surface du corps central de la serpine, mais surtout le lien réactif ($P_1-P'_1$), comme étant un substrat potentiel. La sérine protéinase joue les mêmes actions (au niveau de la reconnaissance initiale et des étapes subséquentes) sur le lien peptidique de la serpine, comme s'il s'agissait d'un substrat, pour le cliver. Voici un résumé des étapes de la réaction de clivage protéolytique d'un substrat protéique : (i) la formation initiale d'un complexe Michaelis non covalent; (ii) l'attaque de la sérine réactive du site actif sur le lien peptidique ($P_1-P'_1$) pour former un intermédiaire tétraédrique (Wilmouth et al., 2001); (iii) le clivage du lien peptidique pour donner un intermédiaire acyle ester covalent, accompagné par la libération du premier produit (le groupe amino du lien peptidique devient libre); (iv) la formation du second intermédiaire tétraédrique passant par l'attaque de l'eau et finalement, (v) le départ du second produit.

À la Figure 4, le schéma réactionnel illustre en premier lieu la voie, avant l'embranchement de la fourche, qui représente le chemin normal de réaction de clivage du substrat par une sérine protéinase, incluant le clivage initial du lien peptidique et la formation simultanée de l'intermédiaire acyle ester covalent entre la sérine réactive du site actif de la protéinase et le groupe carboxyle du résidu P_1 du RSL de la serpine. À l'embranchement de la fourche, il y a deux voies en compétition qui conduisent à des issues distinctes. La première voie (voie du substrat) est la poursuite de la réaction protéolytique complète ainsi que la libération subséquente d'une forme clivée de la serpine. Elle est représentée par une constante de vitesse générale, k_3 . La seconde voie (voie de l'inhibiteur) est la trappe cinétique de l'intermédiaire acyle qui compromet l'efficacité de la protéinase à compléter la réaction protéolytique, représentant le changement conformationnel causé par l'insertion du RSL à l'intérieur du corps central

de la serpine, ainsi que la distorsion du site actif de la protéinase. Elle est représentée par une constante de vitesse générale, k_4 . La distorsion catalytique de la protéinase peut être un processus progressif qui s'accroît avec l'insertion du RSL. Une fois que le processus d'insertion de la boucle est déclenché, sans la possibilité que le mécanisme de déacylation, qui a eu lieu au même moment, ne se produit, ce qui permet de mettre en place le mécanisme d'inactivation du site actif de la protéinase. À ce moment là, l'intermédiaire acyle est considéré de s'être compromis à passer par l'embranchement de la voie de l'inhibiteur. Cet embranchement illustre l'« inhibition du substrat suicide » où la protéinase fut inactivée par sa réaction avec la serpine comme substrat. L'efficacité du piège cinétique est reflétée par une constante de vitesse de la dissociation du complexe serpine-protéinase, k_5 , car elle représente la constante de vitesse où la protéinase complète la réaction protéolytique. Cependant, cette réaction protéolytique se fait à partir d'un intermédiaire acyle où la fonction de la protéinase fut compromise. Il fut estimé que k_5 a, au minimum, un ordre de grandeur de 5 à 7 plus petit que k_3 (Calugaru et al., 2001).

Les étapes qui mènent à la formation d'un intermédiaire acyle enzyme sont typiquement une vitesse limite, tant que les valeurs de k_3 et k_4 n'affectent pas la vitesse générale de la réaction entre la serpine et la protéinase. Cependant, leurs valeurs relatives déterminent les proportions de complexes acyles enzymes qui sont soit dans un état stabilisé, représenté par un complexe cinétiquement piégé avec un lien covalent, ou soit dans un état pour continuer à cliver la serpine, accompagné par la libération de la protéinase active. Si $k_3 \ll k_4$, la réaction est majoritairement inhibitrice, alors que si $k_3 \gg k_4$, la réaction passe majoritairement par la voie du substrat, où peu de protéinases sont piégées dans un complexe covalent.

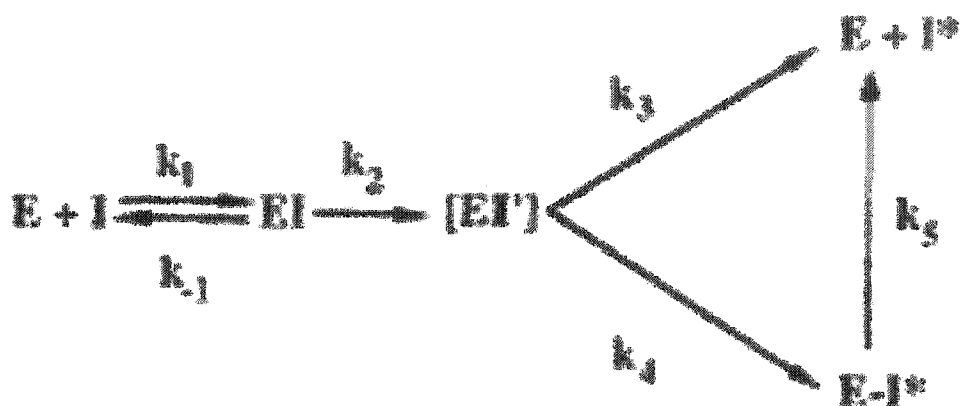


Figure 4 : Mécanisme de la voie fourchée des serpines comme des inhibiteurs de substrat suicide, montrant seulement les intermédiaires essentiels. I représente la serpine et E, la protéinase. La rencontre initiale, avec une constante de vitesse de formation de k_1 et une constante de vitesse de dissociation de k_{-1} , est la formation réversible du complexe non covalent de type Michaelis, EI. Ce complexe progresse à travers d'un intermédiaire tétraédrique covalent normal d'une réaction de clivage du substrat par une sérine (ou une cystéine) protéinase pour former un intermédiaire acyl-enzyme EI', avec une constante de vitesse générale de k_2 . Seulement à ce point, avec le premier groupe parti et le RSL clivé, que le RSL peut s'engager à s'insérer à l'intérieur du feuillet β A, transloquant la protéinase et commettant l'intermédiaire vers un piège cinétique comme le complexe EI*, avec une constante de vitesse k_4 . Puisqu'il y a plusieurs opportunités durant la translocation pour la protéinase, elle peut compléter le reste de la réaction d'hydrolyse du lien peptidique (voie du substrat, avec une constante de vitesse k_3) et s'échapper du piège cinétique, laissant une serpine clivée, I*, au point d'embranchement des voies du substrat et de l'inhibiteur (formant le complexe). Ceci peut être considéré simplement comme étant défini en termes structuraux et, en plus, dépendant de la particularité de la pair serpine-protéinase et des valeurs relatives de k_3 et k_4 . La protéinase piégée cinétiquement en EI* peut décliner à une serpine clivée et une protéinase libre avec une constante de vitesse k_5 , où k_5 est d'habitude « $< k_3$. *Gettins, 2002 Chem. Reviews 102 :4751*

L'équilibre entre les voies du substrat et d'inhibition mène à un concept utile : la « stœchiométrie d'inhibition » ou SI. Il est définie comme étant le nombre de moles de serpins nécessaires pour inhiber 1 mole de protéinase. Représenté en terme de constantes de vitesse, assumant que k_5 est assez petit pour être ignoré (habituellement le cas), le SI est illustré par l'équation 1.

$$SI = (k_3 + k_4)/k_4 \quad (1)$$

Dans le cas où $k_3 \ll k_4$, la réaction devient alors très majoritairement inhibitrice, $SI \sim 1$. Lorsque $k_3 \gg k_4$, la réaction passe alors majoritairement par la voie du substrat, $SI \gg 1$. En sachant que l'intermédiaire acyle enzyme formé entre le P₁ de la serpine et la sérine de la protéinase est normalement stable au SDS, une estimation du SI peut être obtenue à partir des produits de réaction sur un gel SDS-PAGE.

Il y a deux méthodes pour les essais cinétiques d'inhibition avec les serpins. La première méthode est un essai discontinu, où la serpine et la protéinase sont incubées à différents temps. Ensuite, la réaction est mise en présence d'un substrat chromogénique ou fluorogénique pour calculer l'activité protéolytique résiduelle. La deuxième méthode est un essai continu qui est effectué en présence d'un substrat chromogénique ou fluorogénique, où une réduction de la vitesse d'hydrolyse du substrat est enregistrée comme étant une réflexion de l'inhibition de la protéinase par la serpine. Ceci permet d'obtenir une constante de vitesse d'association générale apparente représentant la formation du complexe covalent, k_{apparent} . Cette constante est une sous-estimation de la vitesse réelle d'association, étant donné qu'il y a un recyclage de la protéinase relâchée par une fraction du complexe acyle enzyme suivant l'embranchement de la voie du

substrat. Lorsque la paire serpine/substrat est égale à $SI \sim 1$, l'erreur est très petite. Par contre, lorsque la réaction a un k_3 similaire à la valeur de k_4 , ou plus grande, cela conduit à des erreurs plus grandes. La valeur de k_{apparent} , sous ces conditions, est obtenue par l'équation 2 (dans les conditions où k_5 est très petit pour significativement contribuer à la régénération de la protéinase libre).

$$k_{\text{apparent}} = k_2/K_m \times 1/SI \quad (2)$$

Afin d'obtenir la mesure réelle de la constante de vitesse d'association d'ordre 2 entre la serpine et la protéinase représentant la formation du complexe au point d'embranchement (i.e., k_2/K_m), il faut multiplier k_{apparent} par le SI. Cela permet d'obtenir la constante de vitesse réelle d'association générale représentant la formation de l'intermédiaire acyle enzyme, en plus des étapes impliquées au niveau de la reconnaissance de la serpine par la protéinase et une conversion vers l'intermédiaire acyle.

En particulier, cette constante de vitesse (k_2/K_m) est très utile dans l'évaluation des effets causés par les mutations et les autres perturbations qui influencent les différentes étapes de la réaction, car elle fournit des indices sur les effets, de façon indépendante, qui s'exercent entre les étapes antérieures et postérieures à la formation de l'acyle enzyme et comment les produits se distribuent. Par exemple, une mutation produite à l'intérieur de la serpine ne peut pas affecter seulement la reconnaissance de la serpine par la protéinase ou la vitesse de formation de l'intermédiaire acyle, pourtant elle accroît la valeur du SI causé par un ralentissement de k_4 . En déterminant le k_{apparent} , l'effet de la mutation pourrait être une réduction au niveau de la constante de vitesse pour la réaction. Une fois corrigé par le SI, cependant, l'effet réelle sur la vitesse de la réaction (aucune perturbation) est obtenu. En outre, la hausse du SI révèle que la mutation a affecté les

valeurs relatives de k_3 et k_4 . Plusieurs autres mutations peuvent affecter la vitesse de formation du complexe acyle et le SI.

La finesse du mécanisme de la voie fourchée, qui explique de façon satisfaisante les différents effets de mutations sur les vitesses de réaction des paires serpine-protéinase et sur les modifications du SI, fut historiquement un argument majeur pour ce type de mécanisme plutôt que des voies réactionnelles indépendantes et parallèles conduisant soit à une serpine complexée ou soit à une serpine clivée. Si les voies réactionnelles indépendantes et parallèles existaient, elles seraient traduites par cet exemple : une mutation qui n'affecte pas la voie du substrat (k_3 non affecté), mais qui réduit plutôt la vitesse de la voie inhibitrice (k_4 réduit), ce qui résulte non seulement à une accroissement du SI, mais accompagne aussi une réduction de la vitesse générale de consommation de la serpine. Si le SI de la serpine de type sauvage était proche de 1, il y aurait une très grande réduction du SI, car il impliquerait $k_4 \gg k_3$. Cependant, ce n'est pas ce qui est observé, mais plutôt, une vitesse inaltérée de la consommation de la serpine fut causée par ces types de mutations, comme prédit par le mécanisme de la voie fourchée (Hood et al., 1994).

Diverses mutations de la région charnière qui produisent un accroissement du SI sont causés par des éléments structuraux qui affectent la vitesse à laquelle le RSL s'insère à l'intérieur du feuillet β A. Cependant, il y a d'autres facteurs qui peuvent alors influencer les vitesses reliées à l'insertion du RSL et le clivage de la serpine en affectant le SI. Ces facteurs englobent les altérations causées par la température, le pH, la force ionique ou un cofacteur, qui affectent différemment sur chacune des différentes espèces présentes.

Il est important de réaliser qu'une panoplie de facteurs environnementaux ont des effets directs sur le SI des serpins, qui diffèrent de ceux des inhibiteurs de type non serpine. Ces facteurs sont alors capables de réguler leurs réactions, pas seulement sur la vitesse générale d'inhibition mais aussi sur l'issue de la réaction, telles qu'entre la population de complexes serpine-protéinase inhibés et de serpins clivés. Néanmoins, il peut sembler comme étant peu économique de causer une hausse du SI. Or, la hausse de la population de serpins clivés peuvent jouer un rôle de régulateur de signalisation ou posséder des propriétés désirables. Par exemple, l'ATh clivée possède probablement une activité anti-angionénique (O'Reilly et al., 1999) et les formes clivées l' α_1 -AT (Banda et al., 1988) et l' α_1 -ACT (Potempa et al., 1991) possède une activité chimiotactique.

1.1.9.2. Le complexe initial non covalent de type Michaelis

L'étape critique, pour amener à l'ultime piège cinétique que subit la protéinase par la serpine, est l'étape de reconnaissance initiale qui mène à la formation d'un complexe non-covalent de type Michaelis. Pour les inhibiteurs de type non serpine, cette étape est la seule impliquée au niveau de l'inhibition, ainsi que tous les facteurs qui influencent la spécificité et la stabilité du complexe, dont ils dépendent de la nature et du nombre d'interactions entre les deux protéines à l'intérieur du complexe. Par contre, l'inhibition de type serpine implique la continuité de la réaction au-delà de la formation du complexe non covalent initial. Il y a seulement les aspects de spécificité et de vitesse de la réaction qui sont probablement influencés par la nature du complexe non covalent.

1.1.9.3. Le complexe covalent

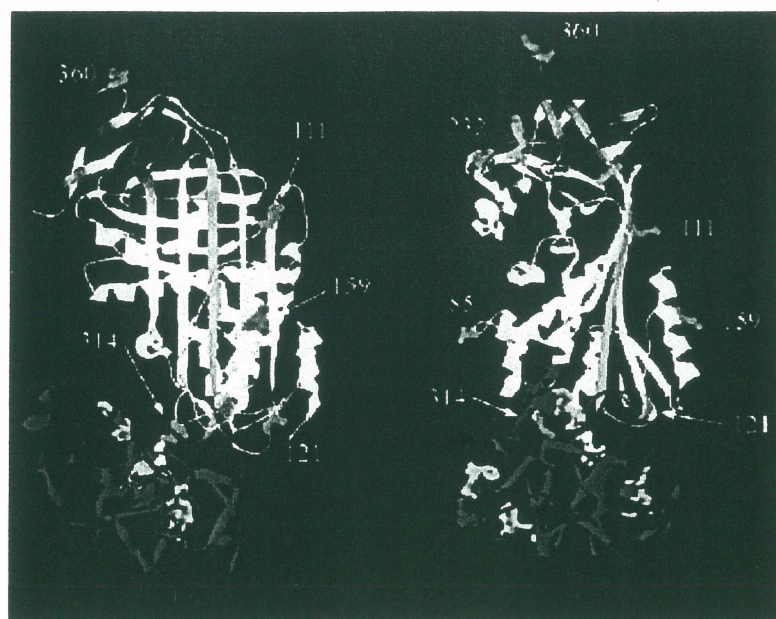
Un trait caractéristique de l'inhibition des sérines protéinases par les serpins est la diminution de la mobilité du complexe inhibé sur SDS-PAGE par rapport à celle de la protéinase ou de la serpine, séparément. Cette mobilité réduite correspond au poids moléculaire de l'espèce qui comprend la protéinase et la serpine liées ensemble. Une caractérisation sommaire de cette espèce de haut poids moléculaire a montré qu'elle implique un lien ester covalent entre le γ O de la sérine 195 du site actif de la sérine protéinase et le groupe carboxyle du lien réactif de la serpine (Jesty, 1979; Jörnvall et al., 1979; Longas et Finlay, 1980), et que ce lien pourrait être dissocié par des nucléophiles forts en libérant une serpine clivée et une protéinase active (Fish et Björk, 1979; Björk et al., 1982). Cela suggère que le complexe stable résistant au SDS implique le même type de lien acyle ester qui serait retrouvé dans la première partie de la voie normale de clivage d'une sérine protéinase. Malgré ce fait, il y a longtemps eu un scepticisme important sur l'existence de cet intermédiaire en solution, sous des conditions physiologiques. Il fut plutôt proposé que le complexe acyle enzyme était un artéfact de la dénaturation au SDS et que cette entité présente en solution était préférentiellement un intermédiaire tétraédrique entre le γ O de la sérine protéinase et le lien réactif de la serpine (Matheson et al., 1991), ou, également, un complexe non covalent dans lequel l'insertion partielle du RSL dans le feuillet β A a induit le restant de la boucle exposée dans une conformation canonique (conformation β allongée), où la protéinase s'est liée par l'intermédiaire d'une interaction classique de type serrure-et-clé (Whisstock et al., 1996). Néanmoins, les évidences mécanistes accumulées sont en faveur de l'implication

indispensable de la sérine du site actif de la protéinase dans le processus initial de la formation du complexe (Olson et al., 1995; Olson et al., 1997) et, plus particulièrement, dans celui qui implique le clivage du lien peptidique et la formation du lien acyle (Lawrence et al., 1995). En conservant cette formation de l'intermédiaire de l'acyle enzyme et la nécessité de l'insertion du RSL comme étant une partie du mécanisme d'inhibition, il fut proposé que la structure du complexe irréversible serpine-protéinase consiste en effet, d'une part, de l'insertion complète de la boucle clivée du centre réactif de la serpine à l'intérieur du feuillet β A comme étant le brin 4 et, d'autre part, de la translocation de la protéinase, unie par un lien covalent, se retrouvant au bout distal du feuillet β A de la serpine (Wright et Scarsdale, 1995; Gettins et al., 1996). Heureusement, cette controverse à propos de la formation du complexe fut par la suite résolue à partir d'études structurales directes sur ces types de complexes.

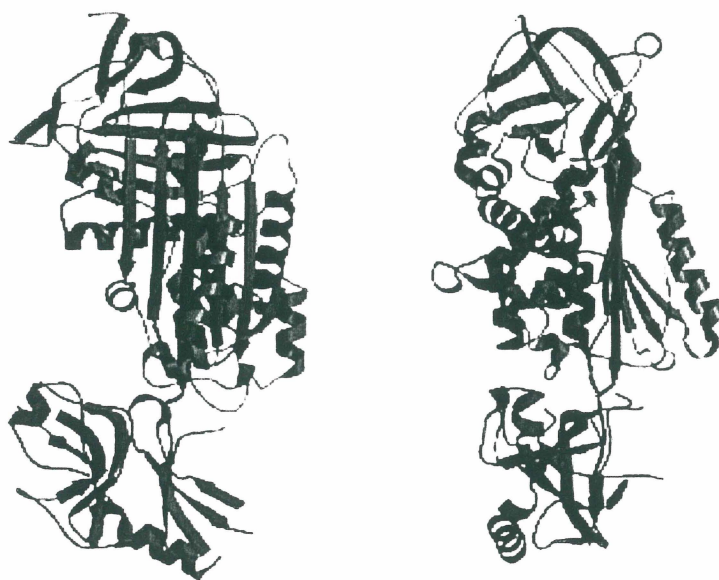
La première évidence directe que la protéinase subit un mouvement significatif durant la formation du complexe fut fournie à partir des mesures de transfert d'énergie de résonance de la fluorescence du complexe entre la trypsine et α_1 -AT Pittsburgh (Stratikos et Gettins, 1997). Cette étude a montré en formulant, a priori, l'hypothèse que ce mouvement moléculaire, impliquant la translocation complète de la protéinase au-delà de 70 Å, est important (Figure 5A) (Stratikos et Gettins, 1998; Stratikos et Gettins, 1999; Fa et al., 2000). Quoique la capacité a déterminé avec précision la localisation de la protéinase et les éléments constitutifs de la serpine par rapport à une autre à l'intérieur du complexe, ces études de fluorescence ne pourraient cependant donner aucune information structurale directe sur la conformation de la serpine ou de la protéinase. Par contre, cette information fut finalement fournie par la détermination cristallographique

par rayons-X du premier complexe serpine-protéinase, à partir de la trypsine bovine complexée à l' α_1 -AT recombinante (Huntington et al., 2000) (Figure 5B).

La structure par rayons-X a confirmé que le complexe inhibé (i) implique la translocation d'une extrémité à l'autre de la protéinase en partant du site initial d'arrimage; (ii) implique l'insertion complète du RSL clivé à l'intérieur du feuillet β A; (iii) est une espèce covalente comportant un lien ester acyle à l' γ O de la sérine du site actif de la protéinase et (iv) implique une perturbation majeure du site actif de la protéinase, accompagné du retraitement de la chaîne latérale du résidu P_1 de la pochette de spécificité S_1 , avec la perte de l'oxyanion étant requis pendant le mécanisme d'hydrolyse afin de stabiliser l'intermédiaire tétraédrique et, par la suite, accompagné d'un déplacement de la sérine catalytique de 6 Å par rapport à son partenaire histidine, dans le relais de charge. Il fut découvert qu'environ 40% de la structure cristalline de la trypsine fut désordonnée et, par conséquent, ne pouvait pas être bien définie dans un modèle final. Cette structure obtenue par rayons-X a permis d'éclaircir de données accumulées et retrouvées dans la littérature. En effet, une étude a montré que la chaîne latérale du résidu P_1 dans le complexe covalent entre le variant P_1 M358W de l' α_1 -AT et la chymotrypsine fut exposée dans un environnement différent et inaccessible à l'intérieur du complexe non covalent (Futamura et al., 1998). Ceci est compréhensible étant donné que la chaîne latérale du résidu P_1 devrait avant tout être à l'intérieur du site actif de la protéinase dans le complexe covalent et séquestrée, sans être toutefois très longtemps dans la pochette S_1 de la protéinase, puisqu'elle aurait été, au départ, enfouie dans cette pochette à l'intérieur du complexe non covalent afin que la protéinase procède à la protéolyse (Ye et al., 2001).

A

FRET

B

X-ray

Gettins, 2002 Chem. Reviews 102 :4751

Figure 5 : Comparaison des structures du complexe covalent entre l' α_1 -antitrypsine et la trypsine déterminé (A) par des contraintes de distance de transfert énergétique de résonance de fluorescence (Stratikos et Gettins, 1999) et (B) par cristallographie par rayons-X (Huntington et al., 2000). Les vues orthogonales sont montrées pour chaque structure. La structure FRET a été modelée en utilisant la trypsine et l' α_1 -antitrypsine clivée comme corps rigides, avec une distorsion des boucles dans la région de contact pour permettre une approche assez près de la sérine γ O du site active de la protéinase au carbonyle P_1 de la boucle du site réactif insérée. La serpine est montrée en jaune, la boucle du site réactif insérée est en bleu et la trypsine est en rouge. Les résidus numérotés sur la serpine sont les sites de marquage fluorescent utilisés dans les déterminations de distance FRET. La structure aux rayons-X a légèrement différent stage de la trypsine et a une densité électronique manquante d'environ 40% de la protéinase, et ainsi il apparaît plus petit que dans la structure FRET. La protéinase est encore montrée en rouge, la boucle du site réactif est en bleu et la serpine est en orange.

Les études par RMN ont montré un changement dans le pK_a de l'histidine du site actif de la protéinase dans le complexe covalent (Plotnick et al., 1996). Ceci est compréhensible, car l'interaction de l'histidine fut altérée avec celle de la sérine du site actif. L'importance est que la structure a expliqué pourquoi l'intermédiaire acyle enzyme est hydrolysé extrêmement lentement, puisqu'elle montre des modifications radicales du site actif au niveau des caractéristiques critiques responsables pour une catalyse efficace. Ces altérations ont provoqué la perte de l'oxyanion stabilisateur et l'éloignement de l' γ O de la sérine de l'histidine dans la triade catalytique. Ces données renforcent l'idée que la protéinase est située à l'extrémité distale du corps de la serpine à l'intérieur du complexe covalent irréversible.

Un autre aspect bien documenté de cette conformation labile est l'augmentation de la sensibilité protéolytique de certaines zones de la protéinase lorsqu'elle est complexée avec la serpine (Kaslik et al., 1997; Kaslik et al., 1995; Stavridi et al., 1996; Egelund et al., 2001). Ces sites deviennent alors plus susceptible à la dégradation dans certaines portions de la protéinase qui sont indéfinies dans la structure cristalline par rayons-X.

Finalement, il y a la question du mécanisme d'inhibition utilisé par les serpins contre les sérines protéinases, qui possèdent un repliement de type chymotrypsine, qui est la même pour l'inhibition des sérines protéinases au repliement de type subtilisine. Les exemples de ces types de protéinase sont la furine, la subtilisine A, la protéinase K, et la subtilisine Carlsberg. D'après le mécanisme de la voie fourchée et la formation des complexes stables résistant au SDS par la représentation des intermédiaires piégés dans une fosse cinétique, ceux-ci furent alors examinés par une étude des réactions de l' α_1 -AT

et de l' α_1 -ACT avec la protéinase K et la subtilisine Carlsberg (Komiyama et al., 1996). Le même mécanisme d'inhibition, opéré sur les protéinases de type chymotrypsine, fut aussi observé dans le cas où l' α_1 -AT inhibe la subtilisine Carlsberg et l' α_1 -ACT la protéinase K, malgré les valeurs élevées du SI. Il fut aussi montré que PI8 (SERPINB8) est un inhibiteur efficace de la furine et de la subtilisine A, opérant par le même mécanisme normal d'inhibition des serpins (Dahlen et al., 1997; Dahlen et al., 1998). Étant donné le mécanisme physique de piège cinétique des sérines protéinases de type chymotrypsine discuté ci-dessus, il se devrait pas être surprenant que les sérines protéinases avec divers repliements pourraient être susceptible de subir similairement une distorsion du site actif par compression.

1.1.9.4. L'exigence pour une insertion rapide de la boucle

Le mécanisme d'inhibition de la voie fourchée des serpins se comportant comme un substrat suicide exige que, pour une inhibition efficace (i.e., SI près de 1), l'embranchement de la voie inhibitrice s'opère beaucoup plus vite que la vitesse normale d'hydrolyse de l'intermédiaire acyle enzyme (i.e., $k_4 \gg k_3$). Avec la structure du complexe serpine-protéinase démontrant que l'inhibition résulte d'une distorsion du site actif de la protéinase, provoqué par l'action de l'insertion complète du RSL, dans laquelle la protéinase s'appuie contre l'extrémité distale de la serpine, ceci exige que la vitesse d'insertion du RSL par rapport à la réaction de clivage du substrat détermine l'efficacité de la voie inhibitrice. L'insertion implique l'incorporation de la région qui est auparavant la boucle exposée à l'intérieur du feuillet β A. Les résidus du RSL qui était

antérieurement dans un environnement exposé au solvant, deviennent alors enfouis à l'intérieur de la protéine. La composition de la boucle, particulièrement les résidus qui seront ultérieurement enfouis, est d'une grande importance sur l'influence de la vitesse d'insertion de la boucle. De plus, étant donné que le résidu P₁₄ de la boucle est la première chaîne latérale enfouie à l'intérieur de la protéine, il n'est pas surprenant qu'il joue un rôle crucial. Une étude a démontré l'importance cruciale du résidu P₁₄ sur l'initiation du processus d'enfouissement de la boucle qui s'insère dans le corps intérieur de la serpine (Hood et al., 1994). Étant donné que la chaîne latérale du résidu P₁₄ deviendrait normalement enfouie par l'insertion du RSL, le remplacement de la thréonine, neutre et petite, par une arginine chargée serait beaucoup moins favorable et augmenterait probablement l'énergie d'activation de l'insertion du RSL. En effet, la structure par rayons-X de la forme clivée d'un analogue du variant arginine P₁₄ de l' α_1 -ACT a montré que l'accommodation de la chaîne latérale chargée de l'arginine fut plutôt tournée vers l'extérieur, face au solvant, plutôt que d'être enfouie, ce qui a alors empêché le corps du résidu P₁₄ de former des liens hydrogènes avec ses brins adjacents du feuillet β A (s3A et s5A) (Lukacs et al., 1996), bien que les résidus subséquents furent encore capable de former des liens hydrogènes corrects avec les brins adjacents du feuillet β A.

Les autres résidus de chiffre pairs (e.g., P₁₂ et P₁₀) peuvent avoir aussi des effets notables sur la vitesse d'insertion de la boucle et sur le SI. Ce qui fut noté en premier lieu, c'est la perte partielle ou complète du comportement inhibiteur de certains variants représentés naturellement par deux serpins. En se basant sur des observations, les effets des mutations dans la région charnière de l' α_1 -AT furent systématiquement examinés. Ces substitutions furent accomplies à la position P₁₂ de l'alanine à la thréonine et à la

position P_{10} de la glycine à la proline (Hopkins et al., 1993). Malgré le changement conservateur à la position P_{12} , il n'y a eu presque aucun effet mesurable sur le SI lors de la réaction avec HNE ou de la réaction avec la trypsine. Néanmoins, le changement le plus drastique vient de la proline à la position P_{10} .

En effet, tandis que les mutations aux positions P_{14} , P_{12} et P_{10} peuvent avoir chacun des effets majeurs sur la vitesse d'insertion de la boucle, il semblerait que le résidu le plus critique est probablement P_{14} , où celle-ci est la première chaîne latérale à s'insérer. Dans les serpinines de type sauvage, une fois ce résidu inséré, il est possible que les résidus subséquents s'insèrent avec plus de facilité, au moins jusqu'à l'hélice F où elle pourrait bloquer l'insertion du résidu P_9 . Il y a deux évidences caractéristiques en faveur de ce phénomène, impliquent l'hybridation ou le déplacement d'un peptide synthétique du RSL.

1.1.9.5. L'importance de la composition de la boucle du site réactif

Au-delà du besoin général d'avoir des résidus non chargés à la position P_{14} et des résidus non prolines aux positions P_{12} et P_{10} , comme décrit ci-dessus, il y a plutôt une restriction au niveau de la nature des résidus à l'intérieur de la région charnière des serpinines inhibitrices, révélée par les comparaisons de séquence des serpinines inhibitrices et non-inhibitrices. En particulier, les résidus P_{12} - P_9 montrent une conservation > 50% d'alanines à chaque position (incluant les résidus P-impair), alors que les serpinines non-inhibitrices ont peu ou pas d'alanines à ces positions et peuvent incorporer plusieurs autres types de résidu (Irving et al., 2000; Hopkins et Whisstock, 1994) (Tableau 2). Ce

patron est maintenu dans la plupart des serpins inhibitrices, sans tenir compte de l'organisme originaire, comme par exemple la série des serpins récemment identifiées dans *Drosophila* et dans *C. elegans*. De plus, le résidu P₈ montre une grande préférence pour la petite chaîne latérale de la thréonine. Dans les serpins inhibitrices, les substitutions permises pour le remplacement de l'alanine sont toutes des petits résidus (surtout la valine, la sérine, la thréonine ou la glycine). Bien que le fondement de ce patron de conservation n'est pas connu, il semble plausible que ceci facilite la poursuite rapide du processus d'insertion : une fois que la chaîne latérale P₁₄ fut incorporée au bout du feuillet β A et qu'elle a parti le processus d'insertion de type fermeture éclair. Plus la chaîne latérale sera petite pour être insérée, plus la cavité créée à l'intérieur du corps de la serpine sera petite, afin de s'accommoder, alors plus bas sera l'énergie d'activation afin que le RSL clivé soit propice à s'insérer facilement à l'intérieur du corps central de la serpine. Chaque résidu qui s'insère est propice à contribuer favorablement à la stabilité thermodynamique de l'état boucle-insérée. L'insertion de la boucle, une fois débutée, est probablement un processus de plus en plus favorable, au point de vu cinétique et thermodynamique, au moins pour les cinq ou six premiers résidus jusqu'à la position P₉, avec aucune accumulation d'intermédiaires représentant les différentes insertions de la boucle. Cette force qui pousse dans la direction de l'insertion peut être nécessaire afin d'assurer l'irréversibilité efficace du processus. Alors que le résidu optimal pour promouvoir l'insertion facile est des petits résidus hydrophobiques, il y a deux études qui appuient l'importance dominante du résidu P₁₄ dans l'initiation de l'insertion, tel qu'une fois débuté, il exige un obstacle majeur comme la proline pour ralentir suffisamment le processus afin d'augmenter considérablement le SI.

Tableau 2 Séquences de la boucle du site réactif pour les serpinines humaines inhibitrices et non inhibitrices^a

serpine	P15	P14	P13	P12	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Inhibitory																			
A1; α_1 -PI	G	T	E	A	A	G	A	M	F	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
A2	G	T	E	A	T	G	A	P	H	L	E	E	K	A	W	S	K	Y	Q
A3; α_1 -ACT	G	T	E	A	S	A	A	T	A	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V
A4; kallistatin	G	T	E	A	A	A	A	T	T	F	A	I	K	F	F	S	A	Q	T
A5; PCI	G	T	R	A	A	A	A	T	G	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
A9; centerin	G	T	E	A	T	A	A	T	T	T	K	F	I	V	R	S	K	D	G
A10; PZI	G	T	E	A	V	A	G	I	L	S	E	I	T	A	Y	S	M	P	P
B1; MNEI	G	T	E	A	A	A	A	T	A	G	I	A	T	F	C	M	L	M	P
B2; PAI-2	G	T	E	A	A	A	G	T	G	G	V	M	T	G	R	T	G	H	G
B3; SCCA1	G	A	E	A	A	A	A	T	A	V	V	G	F	G	S	S	P	A	S
B4; SCCA2	G	V	E	A	A	A	A	T	A	V	V	V	V	E	L	S	S	P	S
B6; P16	G	T	E	A	A	A	A	T	A	A	I	M	M	M	R	C	A	R	F
B7; meginin	G	T	E	A	T	A	A	T	G	S	N	I	V	E	K	Q	L	P	Q
B8; P18	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	V	R	N	S	R	C	S	R	M
B9; P19	G	T	E	A	A	A	A	S	S	C	F	V	V	A	E	C	C	M	E
B10; bomapin	G	T	E	A	A	A	G	S	G	S	E	I	D	I	R	I	R	V	P
B11; epipin	G	T	E	A	A	A	A	T	G	D	S	I	A	V	K	S	L	P	M
B12;	G	T	Q	A	A	A	A	T	G	A	V	V	S	E	R	S	L	R	S
B13; headpin	G	T	E	A	A	A	A	T	G	I	G	F	T	V	T	S	A	P	G
C1; antithrombin	G	S	E	A	A	A	S	T	A	V	V	I	A	G	R	S	L	N	P
D1; heparin cofactor II	G	T	Q	A	T	T	V	T	T	V	G	F	M	P	L	S	T	Q	V
E1; PAI-1	G	T	V	A	S	S	S	T	A	V	I	V	S	A	R	M	A	P	E
E2; protease nexin 1	G	T	K	A	S	A	A	T	T	A	I	L	I	A	R	S	S	P	P
F2; α_2 -antiplasmin ^a	G	V	E	A	A	A	A	T	S		I	A	M	S	R	M	S	L	S
G1; C1-inhibitor ^a	G	V	E	A	A	A	A	S	A		I	S	V	A	R	T	L	L	V
I1; neuroserpin	G	S	E	A	A	A	V	S	G	M	I	A	I	S	R	M	A	V	L
I2; MEPI	G	S	E	A	A	T	S	T	G	I	H	I	P	V	I	M	S	L	A
Noninhibitory																			
A6; CBG	G	V	D	T	A	G	S	T	G	V	T	L	N	L	T	S	K	P	I
A7; TBG	G	T	E	A	A	A	V	P	E	V	E	L	S	D	Q	P	E	N	T
A8; angiotensinogen	E	R	E	P	T	E	S	T	Q	Q	L	N	K	P	E	V	L	E	V
B5; maspin	G	G	D	S	I	E	V	P	G	A	R	I	L	Q	H	K	D	E	L
F1; PEDF	G	A	G	T	T	P	S	P	G	L	Q	P	A	H	L	T	F	P	L
H1; colligin 1	G	N	P	F	D	Q	D	I	Y	G	R	E	E	L	R	S	P	K	L
H2; colligin 2	G	N	P	F	D	Q	D	I	Y	G	R	E	E	L	R	S	P	K	L

^a For α_2 -antiplasmin and C1-inhibitor, the length of the reactive center loop to the P1 residue is only 13 residues. To maintain the alignment of residues within the hinge region as well as at P1-P1', a gap has been introduced, arbitrarily, at position P6.

Dans la région de P_7 à P_1 , il n'y a aucun patron de conservation des résidus, bien que l'exigence générale des résidus hydrophobiques aux positions P-pairs est toujours maintenue. Il y a cependant deux considérations importantes. La première considération est l'importance des résidus conférant la spécificité près du résidu P_1 (discuté ci-dessous dans la section 1.1.9.10.). La seconde se rapporte au processus d'insertion de la boucle vers le but ultime de l'inhibition de la protéinase. Comme discuté ci-dessous dans la section 1.1.9.7., il peut être particulièrement important pour l'insertion de la seconde moitié du RSL d'être hautement favorable énergiquement. Un résidu particulier peut être requis pour donner soit une augmentation favorable dans la stabilité de l'intermédiaire lorsqu'il s'insère à l'intérieur du feuillet β A ou soit une baisse de l'énergie d'activation pour l'insertion. Les deux facteurs peuvent être nécessaires si le passage de la protéinase exige le déplacement temporaire de l'hélice F, qui normalement chevauche le feuillet β A de la protéine native et aussi dans le complexe final.

1.1.9.6. L'importance de la longueur de la boucle du site réactif

Incluant le résidu invariable qui, dans les formes boucle-insérée des serpins clivées, est le point tournant entre le brin s3A et le brin s4A nouvellement inséré (le RSL autrefois exposé), la longueur du RSL jusqu'au lien de scission est presque toujours de 17 résidus (P_{17} - P_1). Les exceptions, peu documentées, sont crmA, l'inhibiteur C1 et l' α_2 -antiplasmine, où la longueur est de 16 résidus. Cette invariabilité est directement liée au mécanisme d'inhibition, exigeant que la protéinase subisse une translocation complète, à partir du site d'interaction initiale vers le pôle distal de la serpine. Et cette localisation est

suffisante pour comprimer la protéinase, avec l'aide de la fin du RSL en la coinçant contre le corps de la serpine, afin que le site actif soit efficacement assez distordu pour créer le piège cinétique. L'exigence de la longueur en résidus pour rencontrer le point critique peut, en effet, être considérée comme la somme de la longueur nécessaire lors de l'insertion pour atteindre l'extrémité du feuillet β A, plus une quantité de résidus qui sont nécessaire pour se lier au carbonyle du résidu P_1 par la sérine 195 du site actif de la protéinase, sans impliquer des encombrements stériques entre les boucles entourant le site actif de la protéinase et l'extrémité de la serpine. Dans cette voie, la disposition de la protéinase nécessiterait, au minimum, des mouvements de la boucle pour éviter ces encombrements. Par rapport à cela, il fut noté, dans la construction du modèle du complexe covalent dérivant des données FRET, que ces encombrements stériques résultent seulement du positionnement de la protéinase exigé par les données expérimentales et où il a besoin d'être allégé (Stratikos et Gettins, 1999). Puisque cette longueur est en fonction de la serpine et de la protéinase, on pourrait envisager une variation dans l'exigence de la longueur pour une serpine donnée, dépendant de la largeur des boucles entourant le site actif de la protéinase.

1.1.9.7. La cinétique et la thermodynamique de la formation du complexe final

La structure par rayons-X du complexe covalent trypsine- α_1 -AT a clairement fournit l'évidence que le mécanisme du piège cinétique dans le complexe est la distorsion du site actif de la protéinase, autant que pour les autres régions de la protéinase. Cette distorsion, cependant, coûte probablement en énergie. L'étude calorimétrique sur divers

serpines clivées et complexées fournit une bonne évidence que la source d'énergie de cette distorsion provient des changements structuraux à l'intérieur de la serpine résultant de l'insertion de la boucle (Boudier et Bieth, 2001), plutôt que d'une série spécifique d'interactions complémentaires serpène-protéinase dans l'état final. Cependant, ceci soulève une importante question concernant les étapes impliquées au niveau de l'accomplissement du piège cinétique dans le complexe final. En tenant compte que si la boucle fut capable de compléter presque à l'achèvement de son insertion sans aucune distorsion de la protéinase ou de déviation de la structure de la serpène par rapport à la forme équivalente boucle-insérée clivée, la stabilité de cet état serait plus grande que celle du complexe final désiré. La différence d'énergie requise est utilisée pour la déformation de la protéinase (Figure 6). En effet, peu importe le mécanisme réaliste pour l'introduction cette distorsion, il ne peut pas impliquer une insertion aisée du RSL, suivie par un loquet spontané de la protéinase à l'extrémité en concomitance avec sa distorsion, car ceci serait, au point de vu thermodynamique, hautement défavorable. Un candidat évident fournissant le mécanisme de couplage est l'hélice F. Cette hélice et la boucle qui la relie au feuillet β A se prolongent au-dessus de la moitié de la partie la plus basse du feuillet β A dans les structures natives, clivées et complexées, obstruant ainsi le site dans lequel le RSL, dans la serpène native, s'insère lors de la formation du complexe et la boucle insérée elle-même dans le complexe final. En effet, même sans protéinase attachée, il peut y avoir un déplacement temporaire de cette partie boucle-hélice F pour permettre l'insertion du RSL, en générant les serpènes boucle-insérée clivées. Avec une protéinase volumineuse attachée à la fin de l'insertion du RSL, cette situation serait exacerbée et pourrait exiger un déplacement énorme de la part de la boucle-hélice F afin

de laisser le passage à la protéinase. Seulement le mouvement de la protéinase « au-delà » du feuillet β A (par l'accomplissement de l'insertion complète ou presque complète) pourrait faire retourner l'hélice F à sa position normale, en presumant que ce déplacement de l'hélice F, loin de sa position favorite, exige une énergie considérable. Ce déplacement, lié au passage de la protéinase, pourrait fournir l'énergie de couplage nécessaire à la distorsion finale de la protéinase.

Un mécanisme fut récemment proposé pour accommoder ces considérations (Gettins, 2002). Ceci est décrit en termes thermodynamiques dans la Figure 6 et schématiques dans la Figure 7. Le mécanisme propose d'abord que, étant donné la localisation de l'hélice F couvrant seulement la partie basse du feuillet β A, l'insertion jusqu'au résidu P₉ ou P₈ peut se produire sans déplacement de l'hélice F, et peut favorablement procéder avec les énergies uniquement déterminées par l'expansion locale du feuillet β A (l'état B). Sur ce point, l'énergie favorable à l'insertion de chaque résidu additionnel du RSL à l'intérieur du feuillet β A est partiellement utilisée pour déplacer de plus en plus l'hélice F (l'état C). Pourvu que le changement net d'énergie pour chaque insertion soit favorable au processus d'insertion, il continuera en direction de l'état suivant (l'état D). Cependant, beaucoup de l'énergie d'insertion n'est pas perdue, mais elle est temporairement emmagasinée dans le déplacement de l'hélice F. Au point final de l'insertion, l'habilité de l'hélice F de retourner à sa position favorite est couplé avec le processus de distorsion de la protéinase. Pourvu que l'énergie de déplacement soit beaucoup plus grande que l'énergie de distorsion, le complexe final se formera alors spontanément et créera le piège cinétique (l'état E). Un estimé fut réalisé pour le complexe élastase porcine- α_1 -AT, où il fut observé que la différence entre la stabilité de

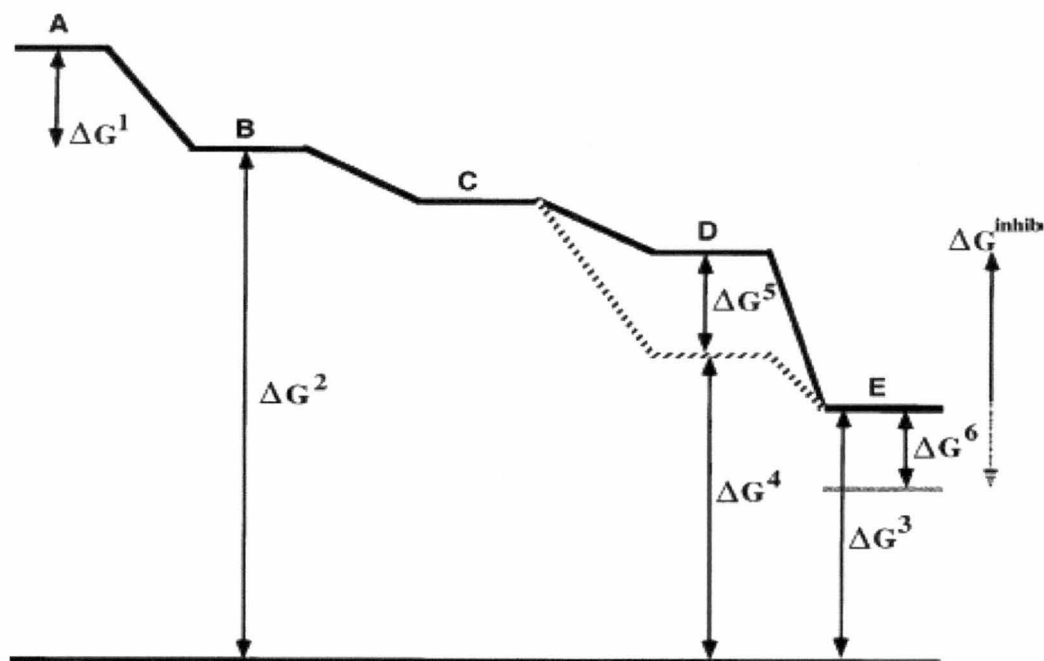


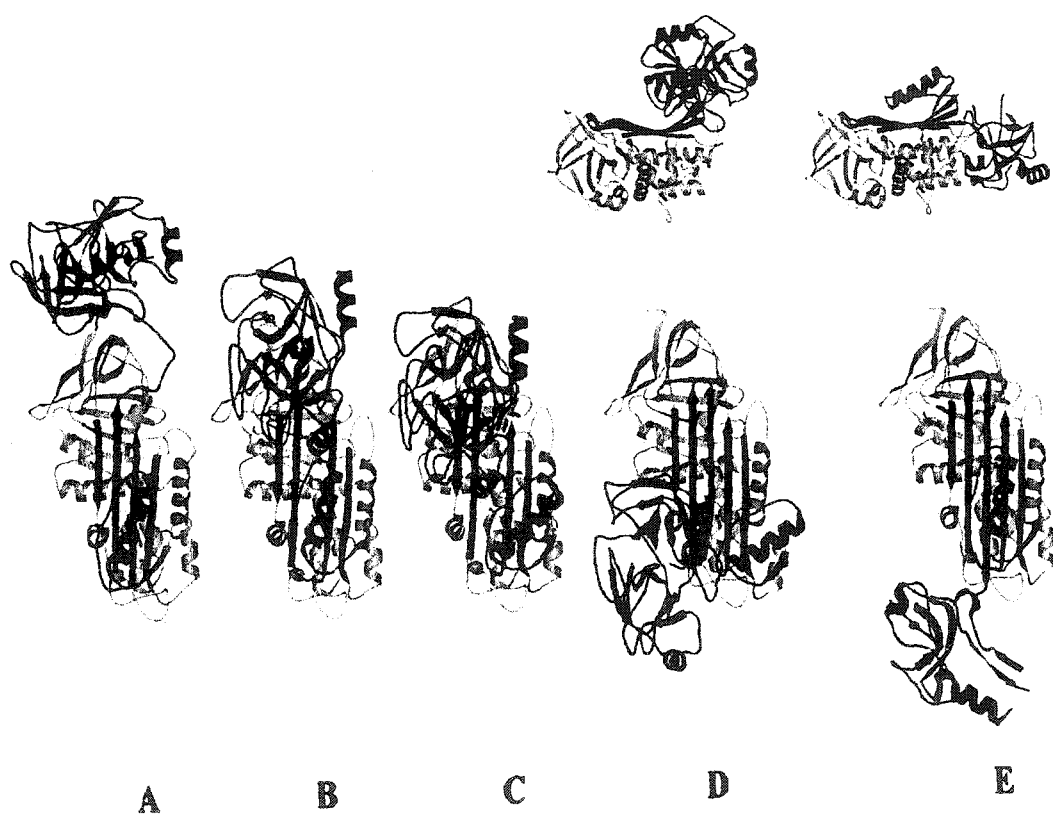
Figure 6 : Diagramme schématique d'énergie pour le mécanisme de couplage proposé dans le texte, et montré en illustration dans la Figure 11, qui permet l'énergie dérivée à partir de l'insertion de la boucle du site réactif pour être « emmagasinée » dans un déplacement de l'hélice F jusqu'au besoin de l'étape finale pour distordre la protéinase et pour assurer que l'équilibre entre l'état de l'avant-dernier et l'état final favorise grandement le dernier. L'énergie dérivée à partir de l'insertion de la boucle peut être considérée d'être en deux parties, ce que implique l'insertion jusqu'environ de P_9 et n'implique pas le besoin de bouger l'hélice F (ΔG^1) et ce que implique pour l'insertion de P_8 à P_1 (ΔG^2). L'énergie pour déplacer l'hélice F est ΔG^4 , tandis que l'énergie pour tirer la chaîne latérale P_1 à partir de la pochette S_1 de la protéinase est ΔG^5 , ainsi l'énergie de l'insertion de la boucle qui est « emmagasinée » est ΔG^4 , si P_1 ne se fait pas tirer et $\Delta G^4 + \Delta G^5$, si il est retiré. ΔG^3 est l'énergie totale requise pour distordre la protéinase, incluant l'extraction de la chaîne latérale de P_1 . ΔG^6 est la stabilisation additionnelle fournie au complexe final, si il y a des interactions spécifiques favorables entre serpène-protéinase dans cet état. L'énergie de stabilisation du complexe inactif final (état E) sur l'avant-dernier complexe (état D), ΔG^{inhib} , est alors $(\Delta G^4 + \Delta G^5) - (\Delta G^3 - \Delta G^6)$, où ΔG^6 est le plus propice d'être dépendant sur la spécificité de la pair serpène-protéinase. Curieusement, ΔG^2 , alors qu'il est nécessaire d'être assez grand pour assurer que la réaction procède vers le complexe final, n'entre pas à l'intérieur de l'expression pour ΔG^{inhib} . *Gettins, 2002 Chem. Reviews 102 :4751*

l'élastase libre et complexée fut d'environ de 6 kcal mol^{-1} (Hervé et Ghélis, 1991). Similairement, l'énergie obtenue de l'insertion de cette région du RSL peut être plus grande que pour le déplacement de l'hélice F, si bien que le processus procède spontanément vers la direction désirée. Par conséquent, l'hélice F se comporte comme un ressort chargé d'un loquet.

1.1.9.8. Stabilité du complexe covalent

En considérant la «stabilité» du complexe covalent serpine-protéinase, il faut considérer la stabilité cinétique d'un intermédiaire acyle enzyme plutôt que la stabilité thermodynamique du produit final. La stabilité cinétique est en fait des produits finaux de la réaction, à savoir la serpine clivée avec la boucle insérée et régénération de la protéinase libre. En effet, les aspects de stabilité qui sont considérés ici sont ceux qui déterminent la vitesse d'hydrolyse de l'intermédiaire acyle en produits finaux.

Une conclusion importante, à partir du modèle ci-dessus, est comment la translocation de la protéinase et l'insertion du RSL à l'intérieur du feuillet β A peuvent se coupler favorablement à la distorsion de la protéinase dans l'état final, où la protéinase est grossièrement distordue, et immédiatement en équilibre avec l'état précédant, dans lequel la protéinase a perdu les interactions importantes avec le résidu P_1 . Ces différents états de la protéinase seraient attendus de posséder des efficacités catalytiques très différentes, et ils détermineraient la stabilité générale du complexe covalent selon l'occupation fractionnelle et l'activité de chaque état.



Gettins, 2002 Chem. Reviews 102 :4751

Figure 7 : Schématique des structures impliquées dans le diagramme d'énergie de la Figure 10 et décrit dans le texte. Le panneau A représente la situation au point de clivage du RSL et avant l'insertion de la boucle. Le panneau B représente le complexe après que les premiers de quelques résidus du RSL ont été insérés et jusqu'à que la protéinase atteint l'hélice F. Le panneau C montre le déplacement partiel de l'hélice F (en bleu) nécessaire pour permettre de continuer la progression de la protéinase (en vert) vers le bas de la serpine. Le panneau D montre le déplacement complète de l'hélice F avec le retraitement des chaînes latérales de P_1 et des autres de la boucle du site réactif à partir de contact avec les sous-sites sur la protéinase. Au-dessus du panneau D, ceci est une vue de côté de la structure D pour montrer que la protéinase est encore « au-dessus » du plan du feuillet β A et autrement non distordue. Ceci représente l'avant-dernier état dans lequel la protéinase n'est pas entièrement longtemps active comme un résultat de la réorientation de l'intermédiaire acyle à l'intérieur du site actif comme une conséquence du retraitement de P_1 à partir de sa pochette de spécificité. Le panneau E montre le complexe final dans lequel l'hélice F est revenu à sa position initiale et la protéinase a été distordue à cause de la compression contre les boucles du bas de la serpine, et, par conséquent, a été entièrement inactive. L'énergie nécessaire à apporter au sujet de cette compression dans un processus général favorable provient à partir du retour de l'hélice F à une position où ses interactions sont optimales. Au-dessus du panneau E, ceci est une vue de côté de la structure pour montrer le mouvement de la protéinase en-dessous du plan du feuillet β A et contre le bas de la serpine.

À l'existence de cet équilibre et des propriétés visiblement différentes de ces états, une étude récente supporte la dépendance du pH sur la dissociation serpine-protéinase pour plusieurs paires serpine-trypsine (Calugaru et al., 2001) et une autre sur la variation de stabilité des complexes α_1 -ACT-HNE (Plotnick, et al., 2002). D'une part, la forme dominante du complexe serpine-protéinase est déacylée d'une manière qui est indépendante de l'histidine de la triade catalytique de la protéinase, et est dépendante seulement de l'hydrolyse non-catalysée par l'intermédiaire de l'hydroxide. L'intermédiaire acyle est partiellement protégé par le solvant. Les propriétés de cet état correspondent bien avec ceux attendus de l'état grossièrement distordu, vu dans la structure cristalline par rayons-X, dans lequel l'histidine a bougé de 6 Å, s'éloignant ainsi du lien acyle. Cependant, en présence de Ca^{2+} , qui se lie à une des boucles du site actif de la trypsine, qui sont désordonnées dans la structure par rayons-X du complexe covalent, la vitesse de dissociation du complexe fut grandement augmentée et la dépendance du pH sur la dissociation revient aux caractéristiques d'implication catalytique de l'histidine. De plus, l'augmentation de la susceptibilité protéolytique de la protéinase dans son état entièrement distordu à l'intérieur du complexe est absente dans l'état partiellement actif, suggérant un degré beaucoup plus petit dans la perturbation structurale. Dans cette étude, les propriétés de l'état actif correspondent exactement avec celles proposées par le présent modèle, à savoir que certains des changements à l'intérieur de la protéinase résultent d'une perte de l'efficacité catalytique, qui a déjà eu lieu dans les étapes précédentes à l'étape finale. En termes de changements physiques grossiers à l'intérieur de la conformation, l'état partiellement actif correspondrait à l'hélice F déplacée par la protéinase, où le RSL est entièrement inséré et où, en ce qui concerne de la sérine du site

actif, la chaîne latérale P_1 est extraite de la pochette S_1 , mais l'oxyanion ne fut pas encore complètement détruit par le retour de l'hélice F à sa position initiale comme étant le résultat d'une compression de la protéinase. D'autre part, avec l'utilisation de différents variants du RSL d' α_1 -ACT, des complexes furent formés dans lesquels ils furent soit assez instables, possédant des demie-vies de quelques minutes jusqu'à quelques heures, ou soit possédant une stabilité normale. Pour le cas du complexe stable, il représente la forme du complexe entièrement inactivé (l'état E dans les Figures 6 et 7), montrant la déacylation comme étant indépendante du pK_a de l'histidine catalytique. Pour les complexes moins stables, l'équilibre entre l'avant-dernier état et l'état final fut, sans doute, déplacé beaucoup plus vers l'avant-dernier état (l'état D dans les Figures 6 et 7). De même qu'avec les paires ATh-trypsine et α_1 -AT-trypsine, il y a eu une dépendance de la réaction de déacylation au pH qui a montrée l'implication de l'appareil catalytique de la protéinase, toutefois avec une vitesse réduite, en se conformant à l'avant-dernier état, comme une enzyme fonctionnelle, mais compromise dans son efficacité catalytique.

1.1.9.9. La protéolyse de la protéinase à l'intérieur du complexe covalent

Il est connu depuis longtemps que la protéinase à l'intérieur des complexes covalents serpine-protéinase a une plus grande susceptibilité à la protéolyse que la protéinase libre (Oda et al., 1977; Fish et al., 1979). En effet, d'après la structure cristalline par rayons-X du complexe α_1 -AT-trypsine, la structure de la trypsine démontre un désordre de ~40% (la région contenant les sites d'augmentation de la susceptibilité protéolytique), ce qui suggère un relâchement de la structure, possiblement apparenté à la

formation d'une forme globulaire désordonnée. Sur SDS-PAGE, cette forme est vu comme des bandes d'une mobilité intermédiaire entre celles du premier complexe covalent formé et celles de la serpine clivée. Quoiqu'elle a été utilisée comme la démonstration d'un état modifié de la protéinase à l'intérieur du complexe (Kaslik et al., 1995; Egelund et al., 2001) et, en plus, elle été reconnue de posséder probablement une signification physiologique, car ces complexes provenant directement de la protéolyse ne libèrent pas la protéinase active par la voie de déacylation (Huntington et al., 2000; Stavridi et al., 1996; Cooperman et al., 1993). Ceci peut servir comme d'un moyen d'inactivation permanente de la protéinase, également s'ils furent dissociés du complexe serpine-protéinase. Sous les conditions *in vitro*, la protéinase responsable de la protéolyse du complexe est typiquement la même protéinase utilisée pour la formation du complexe et présente en excès. Cependant, *in vivo*, la protéinase est aucunement présente, et n'a pas besoin d'être restreinte aux sérines protéinases. L'élastase neutrophilique, présente en forte concentration aux sites d'inflammation, peut être particulièrement importante pour ce type d'inactivation (Stavridi et al., 1996).

1.1.9.10. Les concepts de l'efficacité d'inhibition et la spécificité des serpins

Pour les relations des inhibiteurs de type non serpine de sérine protéinase, l'efficacité d'un inhibiteur est déterminée en fonction de l'affinité avec laquelle il se lie à sa protéinase cible. La sélectivité d'une protéinase par rapport à une autre est déterminée en fonction des affinités de liaisons relatives. Pour ces types inhibiteurs, il implique de décrire l'efficacité en termes de K_i (la constante d'équilibre de dissociation d'inhibition

générale) ou de IC_{50} (l'efficacité d'inhibition d'un inhibiteur à 50% de sa concentration). Pour les serpins, il est important de comprendre la distinction entre « efficacité » d'un inhibiteur et sa spécificité pour une protéinase donnée. Une fois que la serpine a formé un complexe covalent par un piège cinétique avec sa protéinase cible, son efficacité comme inhibiteur est essentiellement de 100%, puisque la seule voie pratique à laquelle la protéinase libre peut se régénérer est davantage une progression vers la réalisation d'une réaction d'hydrolyse, avec une constante de vitesse k_5 très lente, plutôt que la réaction inverse de cette voie. Puisque la formation du complexe piégé est représentée comme le produit d'un embranchement d'une voie à deux réaction, un concept plus utile pour l'efficacité d'un inhibiteur est la valeur du SI. En effet, une serpine avec un SI de 1.00 serait l'inhibiteur le plus efficace. Alors qu'avec un SI de 100, elle se comporterait essentiellement comme un substrat pour la protéinase. Le SI n'est cependant pas dépendant de la concentration et, donc, il ne sert à rien de décrire l'efficacité d'une serpine, comme défini ici, en termes de K_i . Par contre, la constante de vitesse d'association apparente de second ordre de la réaction entre une serpine et sa protéinase pour former un complexe intermédiaire acyle (k_2/K_M), reflétant la spécificité de la réaction. Toutefois, elle ne donne aucune information sur l'efficacité de l'inhibiteur (SI). Deux protéinases peuvent réagir avec la même serpine pour des constantes de vitesse de second ordre qui diffèrent par plusieurs ordres et pourtant les deux peuvent avoir un SI ~ 1 . Pourvu que les deux réactions aient été au bout de leurs exécutions, chaque protéinase serait inhibé avec la même efficacité. Pourtant au point de l'intermédiaire, une protéinase serait inhibée avec un niveau beaucoup plus élevé que l'autre. Ceci est dépendant des

constantes de vitesse d'association de second ordre et des concentrations des composantes.

Les facteurs qui influencent l'efficacité (SI) sont donnés dans une autre section. Ici, on considère la spécificité : les facteurs qui influencent les étapes menant jusqu'à la formation de l'intermédiaire acyle enzyme et qui sont reflétée en terme k_2/K_M . La spécificité des serpin est déterminée pour les mêmes types de considération que la spécificité du substrat pour les protéinases, i.e., k_{cat}/K_M . Cependant, comme illustré ci-dessous, la spécificité de la réaction d'une même séquence entre un peptide libre et une partie du RSL d'une serpine peut être assez différente, résultant des contributions additionnelles au K_M chez la serpine.

1.2. FAMILLE DES CONVERTASES DE MAMMIFÈRE DE TYPE SUBTILISINE/KEXINE

1.2.1. Fonction biochimique de la maturation protéolytique cellulaire

Quelle est la principale fonction biologique de la maturation protéolytique cellulaire? L'origine de cette fonction provient probablement de la nécessité pour les cellules de communiquer entre elles et de se reconnaître afin de survivre dans leur environnement. Or, l'interaction cellule-cellule est une caractéristique des systèmes biologiques très simples, comme elle fut montré par les échanges du matériel génétique entre les bactéries et l'accouplement des eucaryotes unicellulaires, comme les bourgeons de levure de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans les organismes multicellulaires, le

processus de signalisation cellule-cellule devient de plus en plus important. Par exemple, chez les bactéries sociales *Myxococcus xanthus*, l'orchestration de la formation d'un corps de survie requiert de divers signaux intercellulaires pour amener à la différenciation de multiples types de cellule (Shimkets, 1999), tandis que chez les eucaryotes supérieurs, ils dépendent de réseaux extrêmement complexes de signaux pour le développement, la différenciation, la reconnaissance, la réponse des changements environnementaux et les interactions entre cellules.

Beaucoup de la signalisation cellule-cellule dépend de la production et de la sécrétion d'hormones solubles qui peuvent alors voyager vers les récepteurs d'une cellule cible. Pour un organisme complexe comme *Homo sapiens*, le système neuroendocrine mature régule un grand nombre de processus dépendant de plusieurs effecteurs sécrétés. La synthèse de ces molécules est étroitement régulée; par exemple, la proinsuline précurseur de l'insuline est synthétisée et subie une maturation pour devenir une insuline mature, seulement à l'intérieur d'un type de cellule particulière dans un tissu particulier et dans un organe particulier (les cellules des îlots β du pancréas) (Steiner et al., 1996). Dans un cas plus complexe, les multiples molécules sécrétées peuvent être synthétisées à partir d'un précurseur unique tel que la proopiomélanocortine (POMC) (Paquet et al., 1996). La proinsuline, la POMC et plusieurs autres molécules sont synthétisées comme de larges précurseurs qui subissent un clivage protéolytique à l'intérieur des compartiments avancés de la voie sécrétoire eucaryote comme le réseau du *trans*-Golgi (TGN) ou des granules sécrétoires des cellules neuroendocrines pour produire des molécules effectrices matures (Steiner, 2001; Seidah, 2001; Molloy et Thomas, 2001).

Cette excision des hormones protéiques et des neuropeptides matures à partir de larges précurseurs est une fonction biochimique plus spécifique à partir d'un événement plus général à l'intérieur des organismes eucaryotes, par quoi l'endoprotéolyse spécifique est utilisée pour générer une protéine biologiquement active ou mature à partir d'un précurseur inactif (ou proprotéine). Ce processus biochimique est aussi utilisé pour la maturation des récepteurs (Bravo et al., 1994), l'activation d'enzymes digestives telles que la trypsine et la chymotrypsine (Fersht, 1985) et la maturation de glycoprotéines de l'enveloppe virale (Carr et al., 1997), pour en nommer quelques uns. Cette endoprotéolyse spécifique est distincte de l'action des protéinases digestives telles que la trypsine, chymotrypsine, la protéinase K et la subtilisine, car elle s'effectue à des sites très spécifiques, générant une protéine différente plutôt que de dégrader le substrat. Chez les eucaryotes, ils s'étendent des champignons (e.g., *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*) en passant par l'*Hydra* et les animaux supérieurs (e.g., *Caenorhabditis elegans*, *Aplysia*, *Drosophila melanogaster* et les mammifères), où la maturation se présente fréquemment à des motifs contenant de multiples résidus basiques. L'existence d'une telle voie fut aussi récemment démontrée chez les plantes (Kinal et al., 1995; Jiang et Rogers, 1999), mais les enzymes responsables pour cette maturation chez les cellules de plante ne sont pas encore isolées.

Ici, j'exposerai les principales connaissances scientifiques actuelles qui concernent seulement la furine/SPC1, une endoprotéinase de la famille des convertases de mammifères, à propos de ses propriétés biochimiques, sa distribution et sa localisation cellulaire, son importance biologique et physiologique dans l'organisme et son implication dans certaines pathologies.

1.2.2. Découvertes de la première convertase de mammifère : l'origine de SPC1/furine

La furine (aussi appelée SPC1/PACE; E.C. 3.4.21.75, selon la classification de MEROPS, est dans le clan SB, la famille S8) est une endoprotéinase cellulaire qui fut identifiée en 1990. L'identification de la première véritable convertase de proprotéine de mammifère (PC) de type subtilisine aboutie après une recherche de presque un quart de siècle pour trouver les enzymes de mammifère qui catalysent la maturation protéolytique des prohormones et des proprotéines. La quête aux PCs a commencé avec des études sur des glandes séminales par Donald Steiner en 1967 (Steiner et al., 1967; Steiner et al., 1969), qui a montré pour la première fois que les hormones peptidiques sont excisées post-traductionnelles à partir de longs segments protéiques (prohormones) par un clivage du précurseur à des doublets ou des groupes d'acides aminés basiques (par exemple, -Lys-Arg[↓]- et -Arg-Arg[↓]-, où [↓] identifie le site de clivage). Sur les relations structurelles entre la β -hormone stimulante des mélanocytes (β -MSH), de la γ -lipotropine (γ -LPH) et de la β -lipotropine (β -LPH) (Chrétien et Li, 1967) – une série de peptides dérivés à partir d'un complexe protéique de prohormone pituitaire, proopiomélanocortine (POMC) – fournissent le premier indice sur la généralité de la maturation de proprotéine.

Ensemble, ces études fixent les fondations sur les recherches subséquentes au niveau de la maturation de protéines pour les 20 prochaines années, lesquelles ont montré que quasiment toutes les hormones peptidiques, les nombreuses protéines bioactives (par exemple, les facteurs de croissance, les récepteurs et les molécules d'adhésion cellulaire), plusieurs toxines bactériennes et glycoprotéines de l'enveloppe viral suivent ce schéma

de maturation pour générer une molécule mature et biologiquement active. Les enzymes qui catalysent ces réactions vitales ne furent cependant identifiés qu'en 1984, quand l'endoprotéinase de levure, kexine ou Kex2, fut isolée (Julius et al., 1984).

Kex2 excise l' α -phéromone d'accouplement (α -mating pheromone) (une phéromone peptidique qui est sécrétée par les cellules α de la levure stimule l'accouplement des cellules α . L' α -phéromone d'accouplement est synthétisée comme un substrat proprotéique qui est clivé par Kex2. Les cellules α de levure qui n'expriment pas Kex2 sont stériles. Puisque Kex2 pourrait correctement maturer les proprotéines de mammifère, une ou plusieurs PCs de mammifère furent anticipées pour partager des caractéristiques structurales avec celles de la levure (Thomas et al., 1988). Une recherche dans les bases de données a identifié une protéine reportée auparavant pour être encodée par le locus FUR (« la région en amont du gène *fes/fps* ») (Roebroek et al., 1986), dans un cadre de lecture ouvert qui est adjacent au proto-oncogène *fes/fps*, comme étant le premier homologue de mammifère pour Kex2 (Fuller et al., 1989). Le produit de ce gène – la furine – fut bientôt reconnu pour accomplir correctement la maturation des précurseurs des facteurs neurotrophiques, des protéines du sérum et des molécules pathogènes (Molloy et al., 1992; Bresnahan et al., 1990; Wise et al., 1990). Les stratégies de PCR furent alors utilisées pour identifier les six membres restant de la famille convertase (Figure 8; Tableau 3). Ensemble, les PCs catalysent la maturation catalytique d'une énorme variété de peptides bioactifs et de protéines qui régulent quasiment chaque processus impliqué dans l'homéostasie et la maladie.

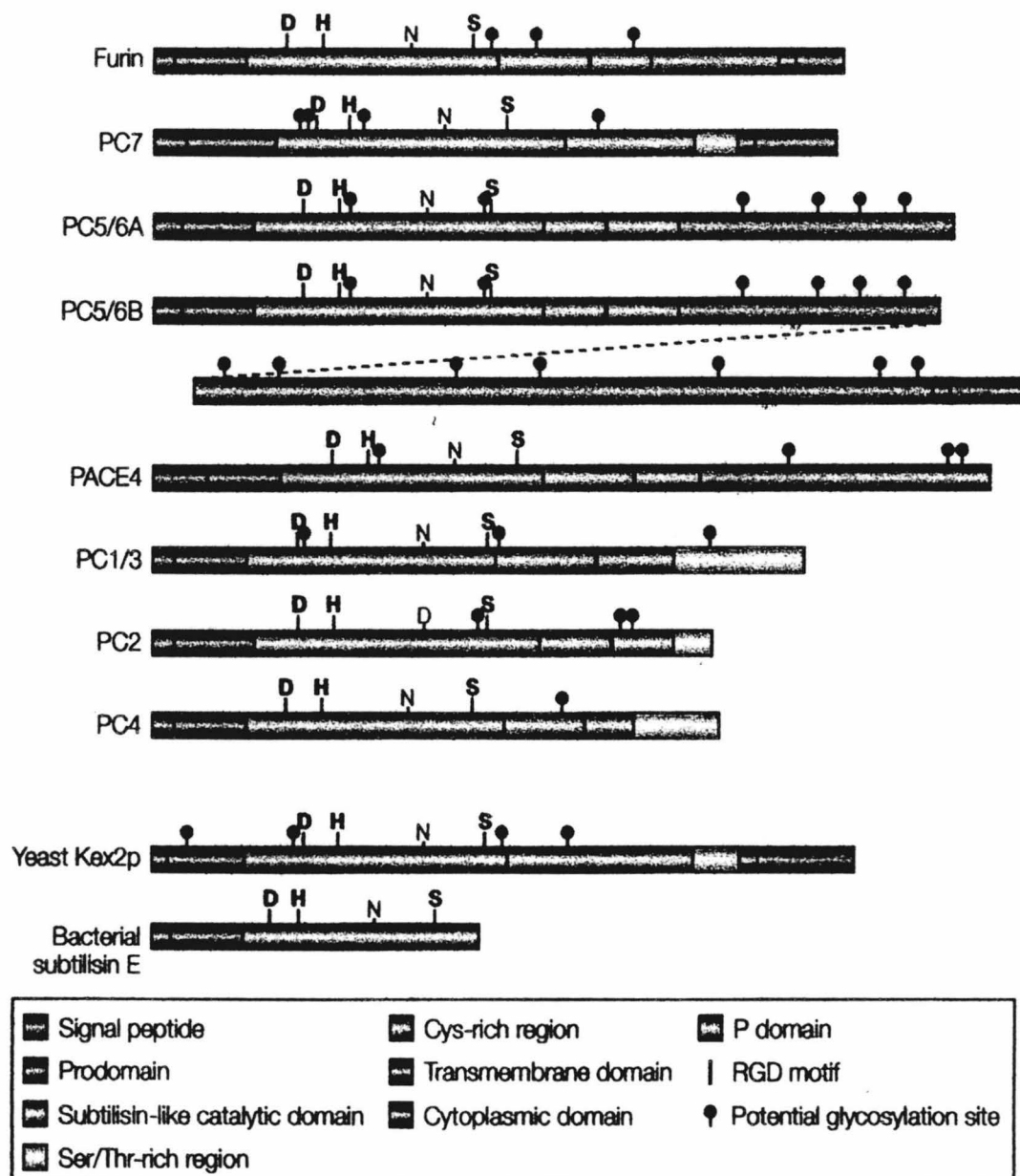


Figure 8 : Diagramme schématique de la famille des convertases de proprotéines de type subtilisine (PC). Les schématiques sont indiquées pour la furine et les six autres PCs. Les schématiques de la Kex2 de levure et la subtilisine bactérienne apparentée à l'évolution (qui manque le domaine P conservé) sont aussi montrées. PC5/6 est exprimée comme soit l'isoforme A ou B. Ces isoformes sont générés par épissage alternatif et la ligne diagonale brisée relie les deux moitiés de PC5/6B. L'isoforme PC5/6B contient tout de PC5/6A excepté pour une petite partie de son C-terminal qui est localisé après le site d'épissage. Les lettres D, H et S en gras soulignent les résidus du site actif, alors que les lettres N et D non foncées soulignent les résidus de la cavité de l'oxyanion.

Tableau 3 | Famille des convertases de proprotéines de type subtilisine/kexine

Proprotein convertase	Size (amino acids)	Tissue distribution	Subcellular localization	Knockout phenotype
Furin	794	Broad	TGN/endosomal	Embryonic lethality (day 10.5), impaired axial rotation
PC7	785	Broad	TGN/endosomal	Viable; misexpression causes thymic defects
PC5/6A*	915	Broad	Secretory granules	ND
PC5/6B*	1877	Broad	TGN/endosomal	ND
PACE4	963	Broad	TGN/endosomal	Embryonic lethality (day 15.5), craniofacial and CNS defects
PC1/3	753	Neuroendocrine system	Secretory granules	Mouse: severe growth defects, defective GHRH and POMC processing, hyperproinsulinaemia *Humans: severe early obesity, adrenocortical insufficiency, hyperproinsulinaemia
PC2	638	Neuroendocrine system	Secretory granules	Hypoglycaemia, proinsulinaemia, glucagon deficiency, defects in opioid peptide processing
PC4	655	Testicular and ovarian germ cells	ND	Males: infertility Females: mild infertility

Included are the phenotypes of the knockout mice for furin⁹⁵, PACE4 (REF. 164), PC2 (REF. 165), PC4 (REF. 166), PC7 (REF. 167 and N. Seidah, personal communication) and PC1/3 (REF. 168). *PC5/6 is expressed as either the A or B isoform. †The phenotype of a patient lacking PC1/3 (REF. 169). See REFS 150,151 and 170 for more comprehensive reviews on the PC family. CNS, central nervous system; GHRH, growth hormone-releasing hormone; ND, not determined; PC, proprotein convertase; POMC, proopiomelanocortin; TGN, trans-Golgi network.

Thomas, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:753

1.2.3. Les propriétés biochimiques de SPC1/furine

Ce paragraphe présentera les différents domaines structuraux de la furine. La furine est une protéine transmembranaire de type-1 (les protéines qui contiennent un seul domaine transmembrane, où le C-terminal est orienté vers le cytoplasme et où le N-terminal est orienté vers la lumière des compartiments membranaires ou extracellulaires) distribué de façon ubiquitaire de 794 acides aminés où elle est retrouvée dans tous les vertébrés et dans plusieurs invertébrés (Seidah et al., 1998; Thacker et Rose, 2000). La famille des convertases proprotéines (PC) (Figure 8; Tableau 3) appartient à la superfamille de la subtilisine des sérines endoprotéinases (les sérines protéases sont composées de la superfamille de la subtilisine et de la chymotrypsine (incluant la trypsine, la thrombine et élastase). Étonnamment, les deux superfamilles ont séparément évolué et, en plus, les atomes qui forment le site catalytique sont dans des positions presque identiques, un remarquable exemple d'évolution convergente. La plus grande similarité de séquence réside dans le domaine catalytique de type subtilisine; les résidus aspartate (Asp), histidine (His) et sérine (Ser) qui forment la triade catalytique (dans les sérines endoprotéinases, la triade catalytique comprend les résidus du site actif optimisés dans l'espace (sérine, histidine, aspartate) qui permettent d'apporter l'hydrolyse du lien peptidique) sont rigoureusement conservés. Les domaines catalytiques des autres PCs sont identiques de 54%-70% par rapport à la séquence de la furine. En plus du peptide signal, où il dirige la translocation de la pro-enzyme dans le réticulum endoplasmique (RE), la furine et les autres PCs possèdent un prodomaine qui est flanqué, du côté N-

terminal, par le site de clivage de la peptidase signal et, du côté C-terminal, par une série d'acides aminés basiques conservés pour le site de clivage autoprotéolytique. Ce prodomaine est essentiel et joue un rôle crucial dans le repliement, l'activation, le transport cellulaire des PCs et la régulation de l'activité de la convertase (Leduc et al., 1992). La furine et les autres PCs partagent également un P domaine conservé, où il est essentiel pour l'activité de l'enzyme, la modulation du pH et le calcium requis (Zhou et al., 1998); ce P domaine est absent chez les subtilisines bactériennes. Le domaine cytoplasmique de la furine contrôle la localisation et la sortie de la furine à l'intérieur du réseau trans-Golgi/système endosomal. En outre, la furine est un modèle important pour la compréhension de la régulation de la circulation protéique dans les cellules de mammifère.

Cette partie présentera les principales propriétés biochimiques de la furine. La furine possède un pH optimum étendu. Il y a une majorité de plus 50% de son activité enzymatique qui se produit entre un pH 5 et 8, qui dépend du substrat à cliver. Comme les autres membres de la superfamille de subtilisine, la furine est strictement dépendante du calcium, exigeant approximativement 1 mM de calcium pour une activité maximale. Les premières études de modélisation de la structure de la furine avec celle de la thermitase bactérienne, une subtilisine très bien caractérisée qui partage 29% d'identité de séquence avec le domaine catalytique de la furine, indiquent que la furine possède deux pochettes de liaison pour le calcium : une avec une affinité moyenne et une autre avec une haute affinité (Siezen et al., 1994) (discuté plus en détail dans la section 1.2.5.). La furine lie faiblement le potassium. L'ajout de 20 mM de potassium augmente l'activité de la furine

en haussant la vitesse de déacylation, où elle est importante au niveau du propre cycle catalytique de la furine (Rockwell et Fuller, 2002).

La furine clive un site consensus peptidique dans lequel elle reconnaît un résidu arginine positionné en C-terminal de cette séquence $-\text{Arg-X-Lys/Arg-Arg}^{\downarrow}-$ (où X est n'importe quel acide aminé et \downarrow identifie le site de clivage). Ce site consensus fut déterminé biochimiquement en utilisant deux véritables substrats *in vivo* de la furine, la toxine de l'antigène protecteur de l'anthrax (PA) et l'hémagglutinine du virus influenza aviaire (HA) (Molloy et al., 1992; Walker et al., 1994). Puisque la toxine PA de l'anthrax et le HA du virus de l'influenza sont clivés à la surface cellulaire et dans la voie biosynthétique/TGN, respectivement, ces études fournissent comme première indication que la furine est active à l'intérieur de plusieurs compartiments cellulaires et est une enzyme clé dans l'activation de divers pathogènes (figure 9). De plus, la furine peut être relarguée de la surface cellulaire par une enzyme non identifiée (Denault et al, 2002; Plaimauer et al., 2001) et se retrouvée, dans le milieu extracellulaire, sous une forme soluble (Vidricaire et al., 1993) dont elle pourrait cliver divers substrats extracellulaires. Les résidus arginines aux positions P₁ et P₄ (Schechter et Berger, 1967)* à l'intérieur de ce site de clivage sont essentiels, alors que l'acide aminé basique en P₂ (Lys/Arg) ne l'est pas, mais il peut augmenter l'efficacité de maturation. Par conséquent, $-\text{Arg-X-X-Arg}^{\downarrow}-$ représente le site de clivage minimal efficace de la furine, quoique les résidus favorables aux positions P₂ et P₆ peuvent compenser un résidu qui est moins favorable à la position

*(une nomenclature grandement utilisée afin d'identifier les résidus qui sont flanqués de chaque côté du site de clivage ou du lien de scission à l'intérieur de la protéine et des substrats peptidiques. Les acides aminés qui sont en N-terminal du lien de scission sont désignés P₁, P₂, Les acides aminés qui sont en C-terminal du lien de scission sont marqués P₁', P₂', ...)

P₄ (Krysan et al., 1999). Par conséquent, dans des cas exceptionnels, la séquence peptidique -Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg¹- peut être clivée par la furine.

Comme décrit ci-dessous, les diverses permutations du site consensus de clivage de la furine ont une implication importante au niveau des substrats proprotéiques, en termes de compartiment spécifique et d'ordre séquentiel des événements de clivage de la furine. Un modèle du domaine catalytique de la furine, basé sur les structures cristallines par rayons-X de la subtilisine et de la thermolysine bactérienne, prédit que les résidus chargés négativement dans les sous-sites S₁, S₂ et S₄ de la pochette de liaison peuvent interagir avec les acides aminés basiques du substrat (Siezen et al., 1994; Sienzen, 1996). Par contre, la structure cristalline de la furine existe seulement depuis très récemment (Henrich et al., 2003), toutefois elle sera décrite plus en détail dans la section 1.2.5.

Sur la base des études *in vivo* des substrats tels que le facteur pro-von Willebrand (van den Ouweland et al., 1990) et le facteur de croissance β des neurones (Bresnahan et al., 1990), la furine a montré de cliver des prosegments en C-terminal de motifs polybasiques. Basé principalement sur des études de la pro-rénine (Watanabe et al., 1992) et des variants de la pro-albumine (Brennan et Nakayama, 1994a; Brennan et Nakayama, 1994b) aussi bien que l'observation des substrats physiologiques proposés de la furine, Nakayama a proposé que la furine reconnaît préférentiellement le motif Arg-X-(Arg/Lys)-Arg (Hosaka et al., 1991); cette séquence est fréquemment référée telle que «le site consensus de clivage de la furine». Thomas et ses collaborateurs ont aussi proposé que le site de clivage minimal de la furine est de la forme Arg-X-X-Arg basé sur des études *in vitro* du clivage par la furine des variants de l'antigène protecteur de l'anthrax (Molloy et al., 1992). Dans une revue en 1997, Nakayama a redéfini davantage

la séquence consensus et a développé les points suivants des règles générales pour la spécificité de la furine (Nakayama, 1997) :

- (i) À la position P_1 une Arg est essentielle.
- (ii) En plus de l'Arg en P_1 , au moins deux à trois résidus en P_2 , P_4 et P_6 sont essentiellement requis pour obtenir un clivage efficace.
- (iii) À la position P'_1 , un résidu avec une chaîne latérale hydrophobique n'est pas souhaitable.

La spécificité de la furine stipule que l'Arg en P_1 est requise pour le clivage. Cependant, l'exigence pour une Arg en P_1 n'est pas absolue, et une seule étude a montré de faibles niveaux de clivage avec une Lys en P_1 (Duguay et al., 1997). En effet, le substrat qui contient une Lys en P_1 peut être clivé avec une efficacité soulignant l'habileté des résidus basiques en P_2 , P_4 et P_6 pour compenser les faibles contacts en P_1 . La présence de résidus basiques en P_2 , dans la spécificité de la furine, a une importance relative et non critique pour un clivage efficace (Krysan et al., 1999). Une des conséquences biologiques reliée à la faible contribution de P_2 au niveau de la spécificité de la furine est que la furine ne clive pas toujours des sites de paires de résidus basiques sans l'addition de résidus basiques en amont du site de clivage. Cette caractéristique de la furine se distingue des protéases de maturation de la voie de sécrétion régulée, telles que PC1 et PC2, qui clivent déjà des précurseurs neuroendocrines à de tels motifs. Vu que le site de reconnaissance minimal de la furine a été proposé de comprendre une Arg en P_4 et en P_1 , la reconnaissance de P_4 est aussi telle qu'en P_1 , contrairement à celle en P_2 , car la furine est capable de discriminer entre l'Arg et la Lys en P_4 . Cependant, la préférence pour l'Arg en P_4 n'est pas aussi restrictive qu'en P_1 . Il a été démontré que l'Arg est plus

favorable que la Lys en P₄ (Duguay et al., 1997). L'Arg en P₄ peut être substituée par une Val puisque la furine a l'habilité de reconnaître des résidus aliphatiques (Lazure et al., 1998). Il semble que la branche-β dans la chaîne latérale de la Val peut jouer un rôle important dans la liaison hydrophobique du sous-site S₄. Les résidus Val en P₄ sont présent dans l'hormone parathyroïde humaine aussi bien que dans l'albumine et le second site de clivage autocatalytique de la furine, et ces sites se présentent avec des résidus basiques en P₁, P₂ et P₆. Évidemment, la Val est un résidu approprié en P₄ pour la furine, et ce fait sert à souligner la similarité entre la spécificité en P₄ de la furine et la dualité basique/aliphatique de la spécificité en P₄ de Kex2. Une caractéristique de la spécificité de la furine que la distingue de certaines autres protéases de maturation est son habilité de reconnaître des résidus basiques en P₆ (Watanabe et al., 1992). Quoique les contacts avec les résidus en C-terminal du lien de clivage ne sont pas requis pour un clivage efficace par la furine, il apparaît que certains résidus sont plus fréquemment rencontrés dans les substrats biologiques potentiels et que certains résidus en P' sont défavorables. Dans la plupart des substrats de la furine, ils ont en P'₁ soient une Ser, une Tyr ou une Phe. Par opposition, les résidus aliphatiques volumineux tels que la Leu et Val sont absents, de même que les résidus basiques aux positions P'₁ ou P'₂. Les résidus acides (Asp et Glu) semblent d'être tolérés en P'₁, de même que l'His. De plus, il a été proposé que les substrats clivés efficacement par la furine ne peut pas contenir des résidus hydrophobiques volumineux aux deux positions P'₁ et P'₂ ni ne peut avoir une Lys à l'un et à l'autre de ces positions (Nakayama, 1997; Lazure et al., 1998).

PC1 clive à des sites dibasiques trouvé dans la proinsuline qui a des résidus basiques en P₁ et P₂ mais non en P₄ (Smeekens et Steiner, 1990; Smeekens et al., 1991;

Seidah et al., 1990; Seidah et al., 1991). Il a été démontré, pour la spécificité de PC1 (Jean et al., 1995), qu'elle clive les substrats tripeptidiques très mal, impliquant la nécessité pour un résidu P₄, mais il est clair que le résidu P₄ nécessaire n'est pas un résidu basique (Lazure et al., 1998; Ledgerwood et al., 1996). Cependant, une His en P₂ réduit le clivage beaucoup plus drastique (Ledgerwood et al., 1996). Ainsi, PC1 semble préférée des résidus basiques en P₄ et en P₂ pour un clivage efficace. Il est clair que PC1 ne peut tolérer certains résidus en C-terminal du lien peptidique de scission (Cameron et al., 2001). En position P'₁, l'introduction des résidus Lys ou Gly était suffisant pour réduire le clivage (Lazure et al., 1998, Ledgerwood et al., 1996). De plus, les résidus basiques sont clairement défavorables en P'₂.

PC2 clive à des sites dibasiques trouvé dans la proinsuline qui a des résidus basiques en P₁ et P₂ mais non en P₄ (Smeekens et Steiner, 1990; Smeekens et al., 1991; Seidah et al., 1990; Seidah et al., 1991). Cependant, une Ala n'est pas tolérée en P₄ (Day et al., 1998). Contrairement, soit l'Arg ou la Met sont tolérées (Johanning et al., 1998), indiquant que la spécificité en P₄ de PC2 est similaire à celle de Kex2. Une étude rigoureuse de la reconnaissance du substrat en P₂ et P₁ n'est pas disponible pour PC2. Il est connu que PC2 a une préférence pour les résidus basiques en P₂ (Cameron et al., 2001), et un substrat avec une Ala en P₂ est clivée très mal par PC2, confirmant le besoin de résidus basiques en P₂. La spécificité en P₁ est quelque peu assoupli dans PC2, avec une légère discrimination entre l'Arg et Lys dans certains cas (Johanning et al., 1998). Il est connu que PC2 est capable de cliver des sites avec une Pro en P'₁.

La spécificité de reconnaissance du substrat par les autres membres de la famille des convertases de mammifère n'est pas très détaillée et caractérisée par rapport à la

furine. PC7 n'est pas capable de cliver des substrats manquant l'Arg en P₄ (Basak et al., 1999; Munzer et al., 1997) mais elle est capable de cliver un substrat avec une Ala en P₂, suggérant un patron de spécificité similaire à celle de la furine. De plus, PC7 semble s'accommoder modérément des résidus hydrophobiques volumineux tels que la Leu en position P₆ et P₇ (Fugère et al., 2002a).

Les exigences du site de clivage de la furine furent utilisées pour produire des inhibiteurs potentiels basés sur des peptides et des protéines afin de bloquer l'activité furine *in vitro* et *in vivo* (Molloy et Thomas, 2001; Komiyama et Fuller, 2000; Cameron et al., 2000). Les deux inhibiteurs de la furine qui sont les plus utilisés sont l'inhibiteur peptidyl stœchiométrique décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH₂Cl et α_1 -AT Portland (α_1 -AT-PDX), un variant de l' α_1 -AT conçu par bioingénierie. Le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH₂Cl inhibe tous les PCs avec K_i de l'ordre du nM (Jean et al., 1998), quoique les propriétés alkylantes du groupe réactif limitent l'utilité de ce réactif. Néanmoins, dans les études cellulaires, le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH₂Cl bloque la maturation de plusieurs substrats de la furine. L'inhibiteur α_1 -AT-PDX fut généré par des mutations du RSL de l' α_1 -AT afin qu'il contienne la séquence consensus minimale du site de clivage de la furine (-Arg-Ile-Pro-Arg-) (Anderson et al., 1993) et il est hautement sélectif pour la furine *in vitro* (K_i = 600 pM). Toutefois, à hautes concentrations, il inhibera les autres PCs (Jean et al., 1998). Dans les études biochimiques, cellulaires et animales, α_1 -AT-PDX fut utilisé pour bloquer l'activité furine et pour prévenir la production des virus pathogéniques, l'activation des toxines bactériennes et les métastases cancéreuses (Molloy et Thomas, 2001).

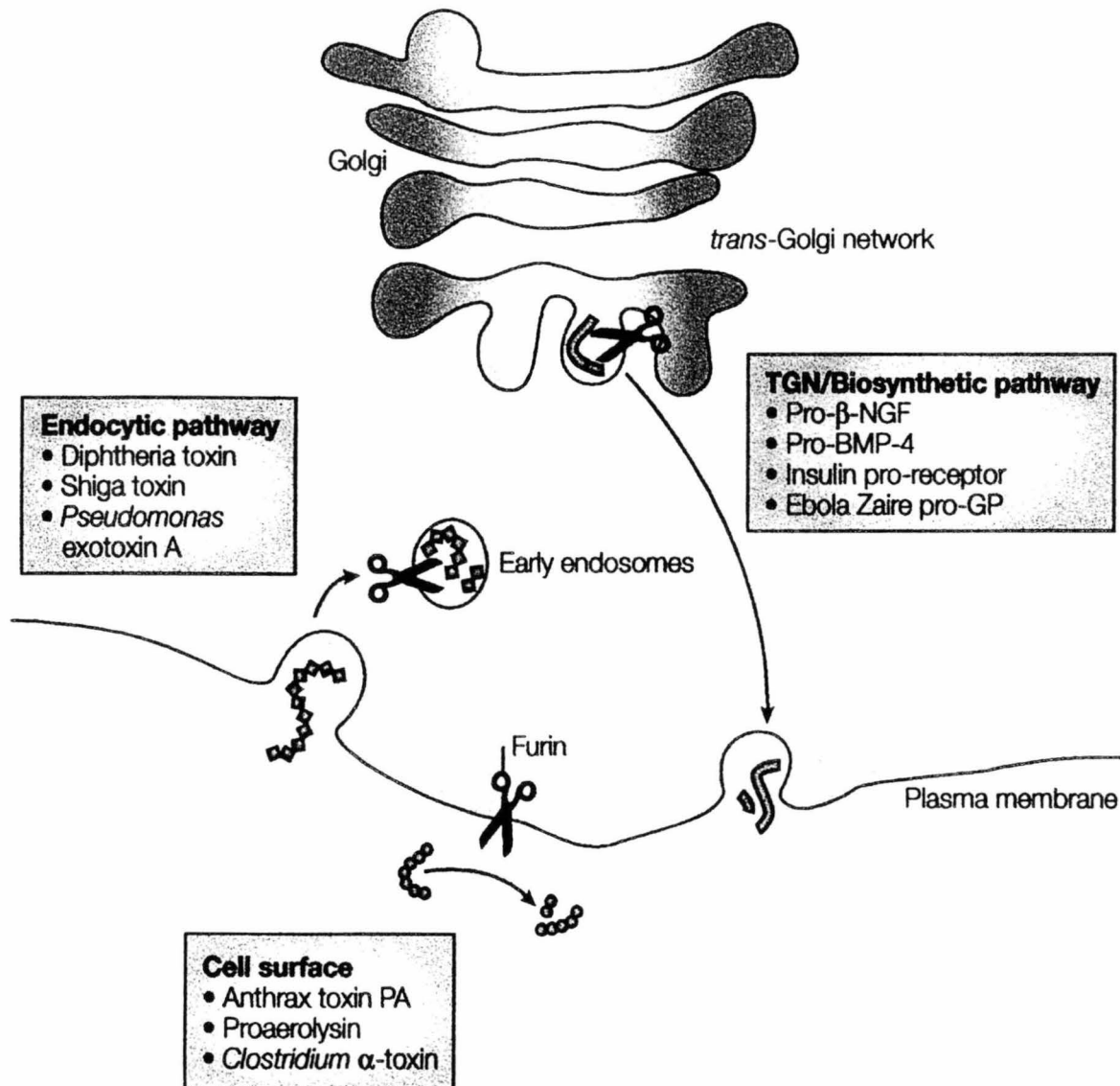


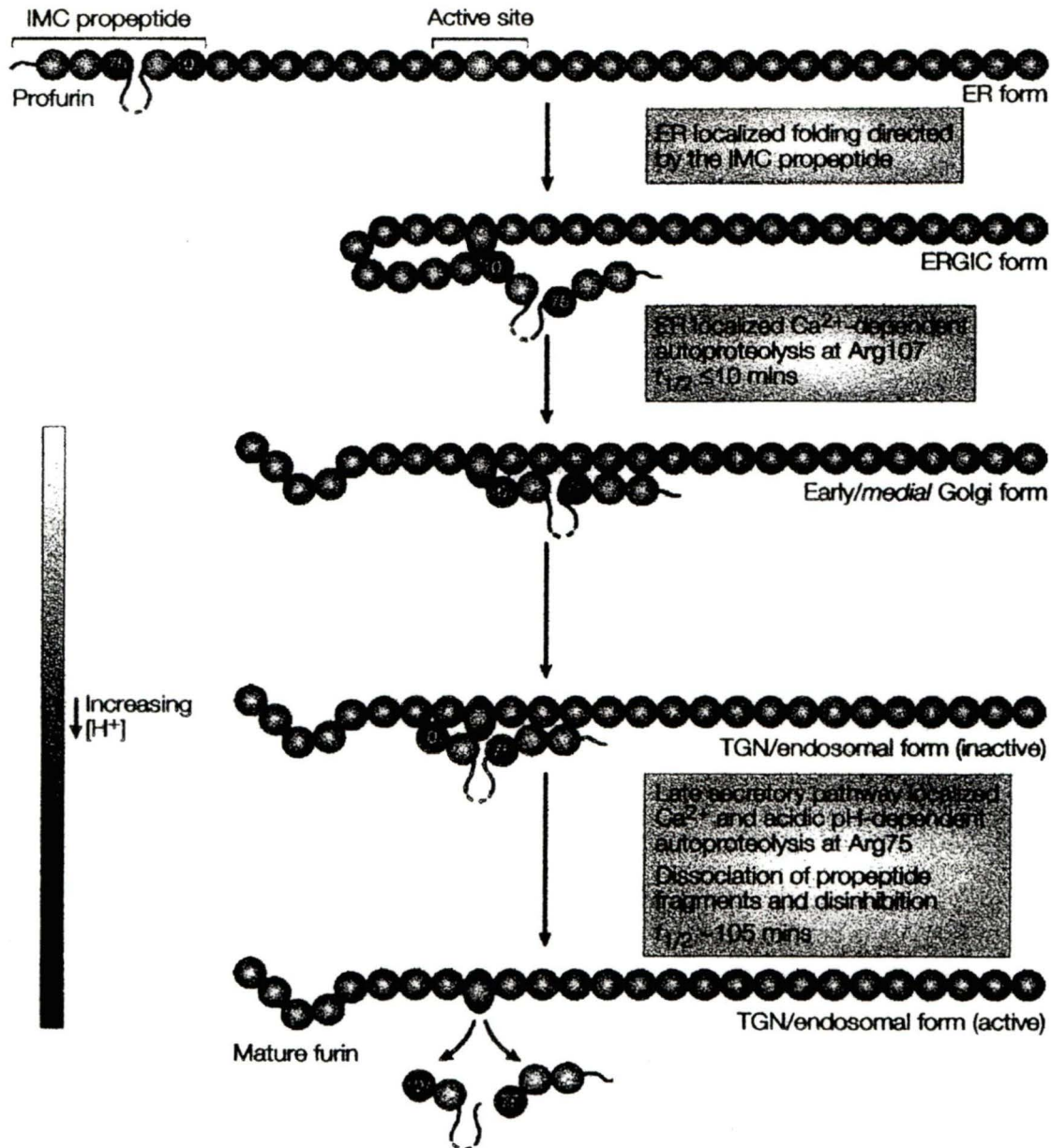
Figure 9 : Les compartiments de maturation par la furine du réseau *trans*-Golgi (TGN)/système endosomal. À l'état stationnaire, la furine (représentée par les ciseaux) est principalement localisée au TGN, où elle circule entre ce compartiment de sortie, la surface cellulaire et les endosomes précoces. Dans la voie TGN/biosynthétique, la furine clive plusieurs substrats incluant le « pro- β -nerve growth factor » (pro- β -NGF), proprotéine 4 morphogénétique de l'os (pro-BMP-4), le prorécepteur de l'insuline et la proglycoprotéine d'Ebola du Zaïre (pro-GP). À la surface cellulaire, la furine coupe des substrats tels que l'antigène protecteur de l'anthrax (PA), la proaérollysine et l' α -toxine de *Clostridium septicum*. Dans les endosomes précoces légèrement acides (voie endocytyque), la furine clive les substrats incluant les toxines de la diphtérie, la toxine Shiga, la toxine 1 de type Shiga et l'exotoxine A de *Pseudomonas*.

Le prodomaine de 83 acides aminés de la furine joue un rôle de chaperone intramoléculaire qui guide le repliement et l'activation de l'endoprotéinase (Anderson et al., 2002). Le repliement du site catalytique de la furine dans une conformation correcte est guidé par un mécanisme de plusieurs étapes dans lesquelles les clivages produits à l'intérieur du prodomaine sont spécifiques à un compartiment cellulaire, où elles donnent une enzyme active (Figure 10). Pour accomplir cette tâche, la furine exploite ses propres règles de reconnaissance du site de clivage et excise le prodomaine deux fois. La première coupure, la plus rapide ($t_{1/2} = 10$ mins), se fait dans un environnement à pH neutre du RE, après l'Arg₁₀₇ du site de clivage consensus de la furine (-Arg-Thr-Lys-Arg₁₀₇[↓]-), où il est localisé à la jonction du domaine catalytique. Le seconde coupure, plus lente ($t_{1/2} < 2$ hrs), se fait après l'Arg₇₅ au site de clivage du propeptide du prodomaine de la furine (-Arg₇₀-Gly-Val-Thr-Lys-Arg₇₅[↓]-), sensible au pH, durant la circulation du complexe furine-propeptide à l'intérieur du système TGN/endosomal légèrement acide. La sensibilité au pH du site de clivage interne du propeptide de la furine est montrée dans des conditions légèrement acides qui sont nécessaires pour le clivage de la proalbumine et de l'exotoxine A de *Pseudomonas* à des sites similaires (Molloy et Thomas, 2001).

La voie d'activation de la furine montre une évolution conservatrice avec celles de la subtilisine bactérienne et de la protéinase α -lytique qui utilisent leurs sites d'excision du propeptide pour guider le repliement du site catalytique, où il résulte d'une réorganisation structurale de la proenzyme repliée (Baker, 1998; Peters et al., 1998; Shinde et Inouye, 1995; Yabuta et al., 2001). La méthode de la double coupure propre à la furine semble être une matrice biochimique qui est utilisée par les membres de la

famille du facteur de croissance transformant β (TGF- β) pour contrôler le signal juxtacrine versus paracrine (juxtacrine est une communication entre les cellules adjacentes, alors que paracrine est une communication entre les cellules qui sont davantage distantes), et par les paramyxovirus afin de produire des glycoprotéines de l'enveloppe qui sont compétentes pour la fusion membranaire.

Cette partie présentera la localisation et la circulation cellulaire de la furine. La libération des fragments du propeptide de la furine fait apparaître son activité protéolytique et sa capacité de cliver des substrats en trans (le clivage cis réfère au clivage autoprotéolytique intramoléculaire d'un propeptide d'une endoprotéinase par sa propre triade catalytique (Leduc et al., 1992). Le clivage trans réfère à la maturation des autres molécules). La furine se localise au TGN – une structure mature du Golgi qui est responsable de la sortie des protéines dans la voie sécrétoire vers leurs destinations finales, en incluant les vésicules de la surface cellulaire, sécrétoires, lysomiales, endosomiales (Griffiths et Simons, 1986; Glu et al., 2001). À partir du TGN, la furine suit un itinéraire de circulation hautement régulé à travers plusieurs compartiments (TGN/endosomiaux et la surface cellulaire) (Molloy et Thomas, 2001; Molloy et al., 1999) (Figure 11). Cet itinéraire explique en partie l'habilité de la furine à maturer une panoplie de divers précurseurs protéiques *in vivo*. De plus, l'étude de la circulation de la furine a permis de découvrir de nouveaux rôles quant à la phosphorylation de protéines, au cytosquelette d'actine et aux adaptateurs de circulation dans la régulation du trafic de protéines qui sont impliquées dans l'homéostasie cellulaire et dans la maladie

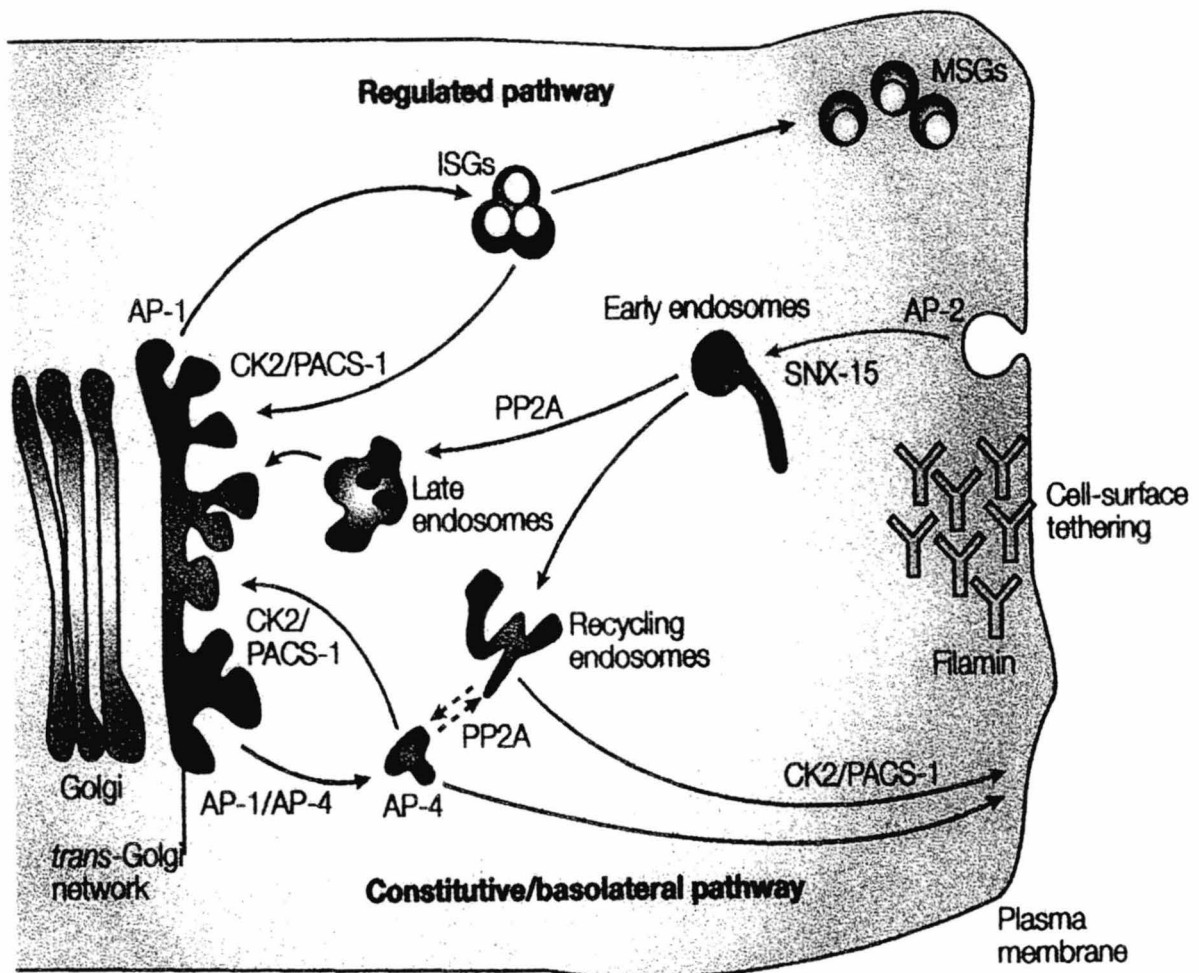


Thomas, 2002 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3:753

Figure 10 : La voie d'autoactivation de la furine. Suivant la translocation et le retraitement de la séquence du peptide signal, le prodomaine de la furine joue comme une chaperone intramolécule (IMC) pour faciliter le repliement du domaine catalytique inactif et non structuré (cercle rose) dans la conformation active (ovale rouge). Après les événements initiaux de repliement dans le réticulum endoplasmique (ER), la furine subit une excision autoprotéolytique intramolécule du propeptide à l'Arg¹⁰⁷. Le propeptide, cependant, reste associé avec le domaine mature et fonctionne comme un fort autoinhibiteur en *trans* durant le transport à la voie sécrétoire tardive. L'excision du propeptide peut être bloquée par l'inactivation de la furine et résulte dans l'accumulation d'un intermédiaire de repliement apparent dans le compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC)/réseau du *cis*-Golgi. Ces données indiquent que les deux compartiments ER et ERGIC participent dans les étapes initiales de l'activation de la furine. Suivant l'excision du propeptide, le complexe propeptide inactif transite aux compartiments sécrétoires tardifs – réseau du *trans*-Golgi (TGN)/endosomes – où le pH relativement acide promouvoit le clivage autoprotéolytique intramolécule du propeptide à un second site interne (Arg⁷⁵). Le clivage du Arg⁷⁵ est suivi par une dissociation rapide des fragments du propeptide et le soulèvement de l'inhibition de la furine par son propeptide.

Avec plusieurs protéines membranaires itinérantes de type 1, la localisation de la furine au *trans*-Golgi et son double cycle dynamique sont contrôlés par des séquences à l'intérieur de son domaine cytoplasmique de 56 acides aminés (Figure 12). La localisation de la furine au TGN exige un motif bipartite (i.e. un motif qui formé en deux parties distinctes) qui est composé d'un groupe acide phosphorylé par la caséine kinase 2 (CK2) (EECPpSDpSEEDE, où p souligne les résidus sérines qui sont phosphorylés) et un segment membranaire proximal contenant deux motifs hydrophobiques (YKGL et LI) (Molloy et al., 1994; Bosshart et al., 1994; Schafer et al., 1995; Jones et al., 1995; Takahashi et al., 1995) (Figure 12). Le motif bipartite contrôle deux étapes d'une boucle cyclique locale : le segment proximal membranaire est nécessaire pour un bourgeonnement efficace de la furine à partir du TGN aux endosomes, alors que le groupe acide phosphorylé dirige la récupération efficace de la furine de l'endosome au TGN (Wan et al., 1998).

La localisation à l'état stationnaire de la furine au TGN a amené à supposer que cette endoprotéinase clive les substrats proprotéiques à l'intérieur de ce compartiment, et plusieurs études supportent ce modèle (Jung et al., 1993; Vischer et Wagner, 1994). Cependant, des études récentes indiquent que les compartiments de maturation peuvent se former à partir de la fusion des compartiments endocytiques contenant la furine avec les vésicules d'exportation qui contiennent les substrats protéiques (Chen et al., 2001; Band et al., 2001).



Thomas, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:753

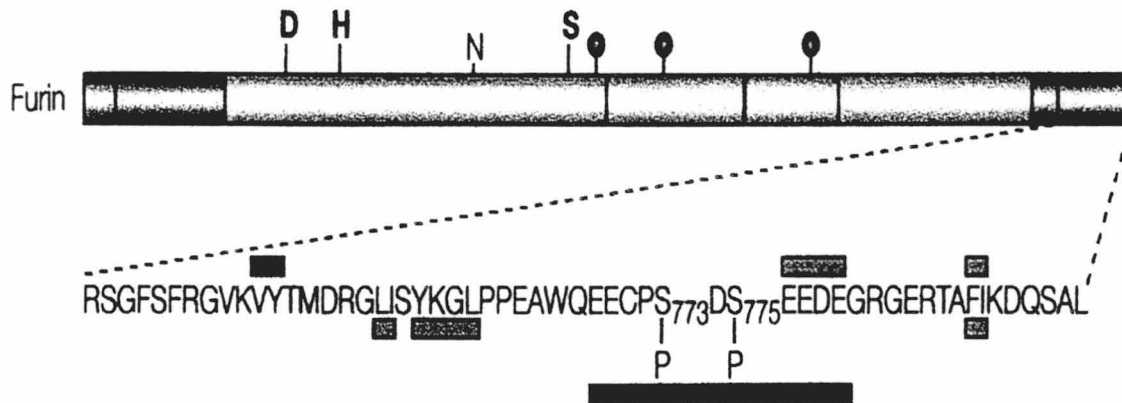
Figure 11 : Modèle de la circulation de la furine dans la cellule. Le bourgeonnement de la furine à partir du réseau *trans*-Golgi (TGN) est causé par la liaison des motifs hydrophobes de sortie de type dileucine ou basé sur des tyrosines à la protéine adaptatrice (AP-1), qui cible la furine aux endosomes, ou la liaison à AP-4, qui cible la furine à la surface basolatérale à partir du TGN ou peut-être des endosomes. Dans les cellules endocrines et neuroendocrines, AP-1 dirige la furine naissante à partir du TGN aux granules sécrétoires immatures (ISGs). La protéine-1 de sortie du groupe acide de la phosphofurine (PACS-1) relie le groupe acide de la furine phosphorylée par la caséine kinase-2 (CK2) à la clathrine/AP-1 pour récupérer la furine au TGN soit à partir des ISGs, avant leur progression aux granules sécrétoires matures (MSGs), ou à partir des endosomes. Les molécules de furine arrivant à la surface cellulaire peuvent être attachées par la filamine protéique du cytosquelette, qui est aussi appelée la protéine de liaison de l'actine (ABP-280). L'internalisation dépendante de la dynamine/clathrine de la furine de la surface cellulaire est principalement causée par le motif basé sur les tyrosines, qui lie à AP-2. Une fois l'intérieur des endosomes précoces, les molécules de furine qui sont déphosphorylées par les isoformes de la phosphatase protéique spécifique-2A (PP2A) sont livrées au TGN, apparemment à travers un compartiment endosomal tardif. Par opposition, la furine phosphorylée par CK2 est recyclée vers l'intérieur de la cellule à partir de la membrane plasmique dans une étape dépendante de PACS-1. D'où, les boucles cycliques TGN et périphériques sont essentiellement des images miroirs de l'un de l'autre. Sur la base d'itinéraire similaire de la carboxypeptidase D (CPD), le mouvement de la furine à partir du compartiment endosomal post-TGN à la surface cellulaire peut aussi requérir à PP2A (lignes brisées). La nexine-15 de sortie (SNX-15), un domaine PX contenant la protéine qui lie les phosphoinositides, module la sortie de la furine à travers les endosomes.

1.2.4. Rôles physiologiques et pathophysiologiques de SPC1/furine

Plusieurs études récentes sur l'analyse de la circulation cellulaire de la furine ont apporté que la furine joue des rôles importants dans l'embryogenèse, l'homéostasie et la maladie. Paradoxalement, malgré le fait que la furine est une enzyme essentielle pour l'embryogenèse, son activité peut aussi mener vers des pathologies fatales chez l'adulte. Cette section présentera quelques exemples de l'implication de la furine dans divers processus physiologiques et pathologiques. La figure 13 montre bien l'importance cruciale de la furine dans certaines voies biochimiques, certains mécanismes de signalisation et certains processus biologiques

La furine n'est pas la seule PC qui est associée à plusieurs cancers. L'homologue de la furine, PACE4 (Figure 8; Tableau 3), est régulée à la hausse dans les tumeurs mammaires (Cheng et al., 1997) et son expression augmente la propriété d'invasion des carcinomes de cellule-squameuse de souris en les convertissant à des carcinomes de cellule fuseau plus agressive, moins différenciée (Mahloogi et al., 2002). Ensemble, ces études indiquent que l'inhibition des PCs peuvent être une nouvelle approche à combattre les divers cancers agressifs.

Les études antérieures montrant le rôle de la furine dans l'activation de la toxine de l'anthrax et la maturation de HA du virus influenza aviaire ont simplement fournit un aperçu du rôle dévastateur de la furine dans l'activation de divers pathogènes bactériens et viraux. La compréhension de l'activation des toxines bactériennes a davantage éclairé les rôles distincts de la maturation de proprotéines catalysée à la surface cellulaire ou aux.



■ Multiple hydrophobic motifs

- Mediate AP-1 adaptor binding (μ 1a) and TGN export
- Mediate AP-2 adaptor binding (μ 2) and internalization
- Part of bipartite TGN-localization and basolateral-sorting signals

■ Acidic cluster/TGN sorting signal

- Part of bipartite TGN localization signal
- Directs TGN localization by binding PACS-1
- Phosphorylation state regulates PACS-1 binding and trafficking
- Phosphorylated by CK2
- Dephosphorylated by PP2A (B family regulatory subunit specific)

■ Filamin (ABP-280)-binding signal

- Tethers furin by crosslinking to the actin cytoskeleton
- Regulates recycling of furin from the cell surface
- Might localize furin to subdomains of the plasma membrane

■ Basolateral sorting signal

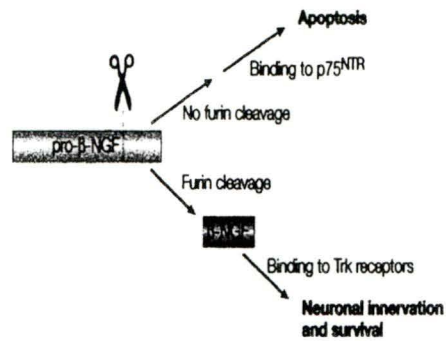
- Directs surface localization in polarized cells
- Binds to AP-4 (μ 4 subunit)

Figure 12: Les motifs de sortie du domaine cytoplasmique de la furine. La représentation schématique montrée est la séquence du domaine cytoplasmique de la furine humaine. Les divers motifs de sortie intracellulaire sont indiqués. Voir le texte pour plus de détails. ABP, protéine de liaison de l'actine; AP, protéine adaptatrice; CK2, caséine kinase-2; PACS-1, protéine-1 de sortie du groupe acide de la phosphofurine; PP2A, protéine phosphatase 2A; TGN, réseau *trans*-Golgi. Thomas, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:753

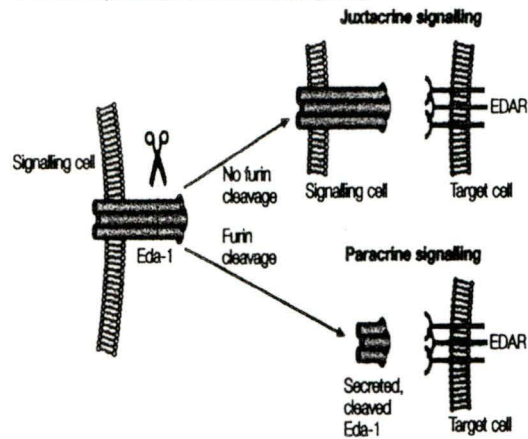
endosomes immatures par la furine, fournissant la seule perspective afin d'éclaircir la régulation de la circulation protéique à l'intérieur des cellules de mammifère. La furine à la surface cellulaire active la toxine d'anthrax (Molloy et al., 1992; Klimpel et al., 1992) – une arme du bioterrorisme (Jernigan et al., 2001) – ainsi que la toxine aérolysine, qui est un agent causal de plusieurs maladies transmises par la nourriture (Abrami et al., 1998), comme la toxine α de *Clostridium septicum*, qui cause la gangrène gazeuse (Gordon et al., 1997) (Figure 9). Le clivage de chaque toxine est une étape obligatoire pour être capable de former des pores dans les membranes cellulaires.

La toxine de l'anthrax comprend trois protéines : PA, l'antigène protecteur, ainsi appelé pour son habilité à induire une protection immune contre l'anthrax; et deux protéines toxiques – le facteur létal (LF) et le facteur d'œdème (EF) (Mock et Fouet, 2001). LF est une métalloprotéinase qui clive les MAPK kinases, alors que EF est une adénylate cyclase dépendante de la calmoduline (Mock et Fouet, 2001). La molécule PA de 83 kDa qui est sécrétée des bactéries s'attache au récepteur de la toxine de l'anthrax (ATR) (Bradley et al., 2001) et est ensuite clivée à la surface cellulaire par la furine pour générer un fragment de 63 kDa attaché aux cellules et un autre polypeptide de 20 kDa (Figure 14). La molécule de PA attachée aux cellules s'heptamérise, lie l'un ou l'autre des deux facteurs de la toxine et est ensuite internalisée à l'intérieur des endosomes immatures (Beauregard et al., 2000). Dans l'environnement acide des endosomes immatures, l'heptamère de PA forme un canal membranaire qui transporte les facteurs de la toxine à l'intérieur du cytoplasme cellulaire de l'hôte, qui résulte d'un œdème, d'un choc systémique et la mort (Figure 14).

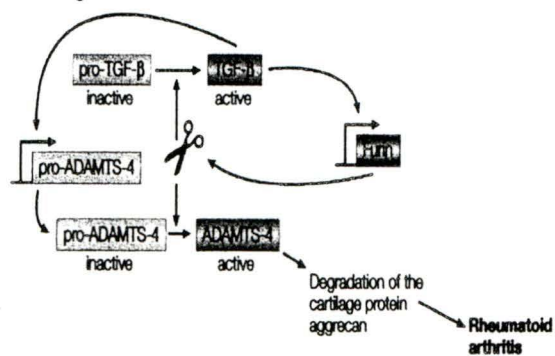
a Neuronal innervation



b Control of juxtacrine versus paracrine signalling



c Cartilage breakdown



d Tumour metastasis

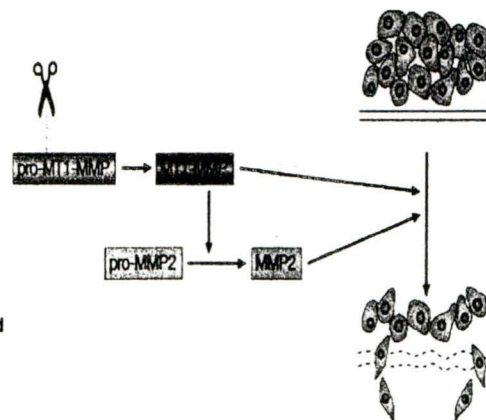
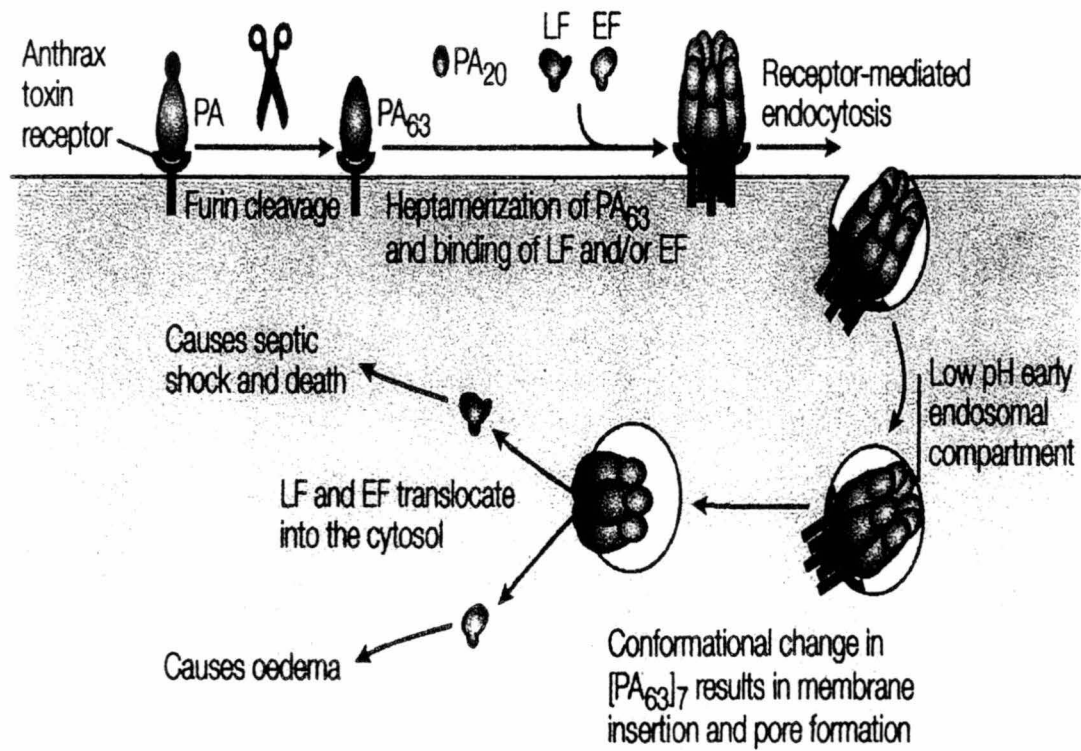


Figure 13 : La furine dans le développement, l'homéostasie et la maladie. a) Le clivage causé par la furine du « pro- β -nerve growth factor » (NGF) produit la neurotrophine de 13kDa de la β -NGF qui se lie aux récepteurs Trk pour promouvoir l'innervation synaptique. Par opposition, l'inhibition ou la séquestration de la furine résulte de la sécrétion de la pro- β -NGF qui se lie au récepteur neurotrophine de 75 kDa (p75^{NTR}) pour promouvoir les voies de la mort cellulaire. b) L'ectodysplasine-A (Eda-1) est un membre de la famille de facteur trimérique de tumeur nécrotique qui stimule la morphogenèse des structures ectodermes par l'activation de son récepteur, EDAR, sur les cellules cibles. Eda-1 peut signaler dans une manière juxtacrine par la liaison à EDAR sur les cellules adjacentes. Cependant, le clivage de Eda-1 ancrée à la membrane par la furine libère le ligand et le permet de signaler à travers de EDAR sur les cellules distantes dans une manière paracrine. c) Dans les synoviocytes, la furine et le facteur de croissance transformant (TGF- β) participent à une boucle rétroactive positive qui résulte d'un haussement des niveaux d'une « a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-4 » (ADAMTS-4, ou aggrecanase-1). La furine clive la proTGF- β et la proADAMTS-4 pour produire un facteur de croissance et une protéinase actif, respectivement. La forme mature sécrétée de TGF- β donc se lie à son récepteur et, à travers la voie convergente de SMAD2 et « mitogen-activated protein kinase (MAPK), augmente l'expression de la furine. Les niveaux augmentés de la furine mènent à une accroissement de TGF- β , qui crée une boucle rétroactive positive. Dans les synoviocytes, TGF- β stimule aussi l'expression de proADAMTS-4. Alors, à cause que la furine et de TGF- β sont dans une boucle positive, les niveaux d'ADAMTS-4 active sont très élevés, ce qui mène à la destruction de l'aggrecane protéique du cartilage et d'où l'arthrite rhumatoïde. d) La furine active plusieurs métalloprotéinases de la matrice de type membranaire (MT-MMPs) qui sont impliquées dans la formation de tumeur et de métastases. La MT-MMP1 activée par la furine active la MMP2 (gélatinase), qui dégrade la matrice extracellulaire, et MT-MMP1 dégrade elle-même aussi directement la matrice extracellulaire.

En absence de la furine, la toxine ne peut s'assembler et n'est pas létale (Gordon et al., 1995). De plus, la mutation du site de clivage de la furine résulte d'une protéine dominante-négative qui se lie à ART mais ne permet pas l'oligomérisation (Sellman et al., 2001). La proaérollysine et l' α -toxine de *Clostridium septicum* se lient aux molécules ancrées de glycosylphosphatidylinositol. Similairement à l'activation du PA, ces toxines protéiques requièrent d'être cliver par la furine afin de former des pores heptamériques perméables aux ions dans la membrane plasmique de la cellule hôte, ce qui amène à la toxicité cellulaire (Ballard et al., 1993; Schiavo et van der Goot, 2001).

La furine, à l'intérieur de l'endosome immature, active d'autres toxines bactériennes, incluant l'exotoxine A de *Pseudomonas* (PEA), la toxine shiga (ST), la toxine-1 de type shiga (ST-1), les toxines de la diphtérie (DT) (Molloy et Thomas, 2001) (Figure 9). Différemment des toxines activées à la surface cellulaire, ces toxines sont toutes des toxines de type A/B qui contiennent un domaine actif (A) et un domaine de liaison (B) qui sont reliés par un site de clivage de la furine (Schiavo et van der Goot, 2001). Suite à la liaison au récepteur, chaque toxine entre par endocytose dans les endosomes immatures, où elle est clivé par la furine. Le clivage de ST, ST-1 et PEA par la furine exige un pH acide qui est caractéristique des compartiments endosomiaux immatures, alors que le clivage de DT ne l'est pas (Molloy et Thomas, 2001). De même pour les modèles cancéreux discutés, l'inhibition de l'activité de la furine par le dépôt extracellulaire de l' α_1 -AT-PDX protège les cellules de PEA et les autres toxines bactériennes (Jean et al., 1998). La sensibilité des cellules au PEA est augmentée en absence de la filamine (Figure 11), qui s'attache normalement à la furine à la surface



Thomas, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:753

Figure 14 : L'activation par la furine de la toxine d'anthrax. Le clivage de l'antigène protecteur de l'anthrax (PA) par la furine mène à l'internalisation et l'activation du facteur létal (LF), qui est une métalloprotéinase à zinc qui clive les kinases du « mitogen-activated protein kinase » (MAPK), et le facteur d'œdème (EF), qui est une adénylate cyclase dépendante de la calmoduline. EF cause la formation d' « eschar », qui sont des masses noires de tissu nécrosé de type jaune, et l'œdème massif des tissus mous (Mock et Fouet, 2001). Chez les macrophages pulmonaires, LF phagocyté mène à des changements dans les niveaux du facteur nécrotique de tumeur α (TNF- α) et de l'interleukine-1 β , aussi bien que l'apoptose. Les niveaux altérés de cytokines couplés avec le système immunitaire inné paralysé résulte rapidement à un choc systémique induit par l'anthrax et la mort par un processus complexe non résolu.

cellulaire, indiquant que la filamine peut contrôler la formation des compartiments endosomiaux de maturation pour la furine (Liu et al., 1997). La structure cristalline de PEA montre que l'exposition de la molécule à un pH acide fait apparaître le site de clivage de la furine, ce qui au moins explique partiellement l'exigence d'une maturation dépendante du pH acide par la furine (Wedekind et al., 2001).

Étonnamment, le clivage par la furine permet à PEA, ST/ST-1 et DT une translocation au cytosol passant par trois voies distinctes de circulation cellulaire. Suite au clivage, le domaine B de DT forme un canal à l'intérieur de la membrane endosomiale immature pour permettre le transport du fragment A dans le cytosol de la cellule hôte (Senzel et al., 1998). Par opposition, le transport au cytosol de PEA et ST/ST-1 requiert une circulation rétrograde au RE, où les toxines subissent apparemment une translocation au cytosol passant par un canal SEC61 (la principale protéine qui forme le pore à l'intérieur de la membrane du RE afin de faciliter la translocation des protéines naissantes nouvellement synthétisées dans la voie sécrétoire. Le canal SEC61 peut aussi être un conduit pour la translocation inverse (dislocation) des protéines du RE à l'intérieur du cytoplasme) (Girod et al., 1999; Jackson et al., 1999). La circulation rétrograde du PEA requiert un récepteur KDEL (une protéine membranaire localisée au Golgi qui se lie aux motifs KDEL (-Lys-Asp-Glu-Leu-) en C-terminal, qui sont présents sur plusieurs protéines résidentes du RE qui s'échappent du Golgi et qui sont récupérées du RE) (Girod et al., 1999; Jackson et al., 1999), alors que ST/ST-1 clivées trafiquent au RE en passant par une voie qui est indépendante du récepteur KDEL et COPI (complexe protéique coatomère I) (un type de manteau spécifique aux vésicules qui trafique principalement

entre la citerne de Golgi et le RE. Aussi rapporté aux endosomes immatures), ce qui indique que les manteaux des vésicules, autre que COPI, dirigent leur récupération au RE. Cependant, la récupération de ST/ST-1 est dépendante de RAB6, une petite GTPase qui contrôle le transport intra-Golgi et le recyclage des glycosyltransférases résidentes du Golgi vers le RE (Girod et al., 1999; Jackson et al., 1999; Storries et al., 1998). Comme il fut aussi suggéré que la furine peut sortir du RE pour métaboliser les récepteurs de l'insuline mal repliés, il serait important de déterminer si la furine peut aussi sortir par la voie de ST/ST-1 (Bass et al., 2000).

Plusieurs virus pathogéniques, incluant le virus influenza aviaire, le VIH-1, le virus de la rougeole et RSV, expriment des glycoprotéines de l'enveloppe viral qui peuvent être clivées à des sites consensus de la furine pour former une glycoprotéine de l'enveloppe mature et fusogénique (Molloy et Thomas, 2001; Molloy et al., 1999).

VIH-1 semble maintenir un avantage sélectif pour la croissance en utilisant un site furine suboptimal à l'intérieur de sa glycoprotéine de l'enveloppe, alors que l'analyse du tropisme viral (les déterminants moléculaires qui permettent à un virus de se répandre à travers le corps) montre que la virulence (l'élargissement ou le degré auquel un pathogène peut causer une maladie) de plusieurs virus mortels (incluant le virus influenza aviaire, le virus de la maladie Newcastle et, potentiellement, le virus de l'Ebola) est directement corrélée avec l'habilité de ces virus à incorporer un site de clivage consensus de la furine à l'intérieur de leurs protéines de l'enveloppe (Zambon, 2001; Takada et Kawaoka, 2001; Feldmann et al., 1999; Rott et al., 1995). Par exemple, la pathogénèse des virus influenza aviaires fut longtemps reconnue pour être directement corrélée avec les propriétés protéolytiques de son précurseur protéique de fusion HA₀, qui est clivée par

la furine afin de générer le complexe HA₁-HA₂ compétent pour la fusion. Similaire au gp160 de VIH-1, le clivage de HA₀ expose le peptide fusogénique localisé au N-terminal de HA₂, qui peut se fusionner avec les membranes cellulaires cibles.

Les virus influenza aviaires avirulents, qui n'ont aucun site consensus de la furine à l'intérieur HA₀, causent une infection localisée à l'intérieur du tractus intestinal. Cependant, la mutation du site de clivage de HA₀ au site consensus de la furine permet au virus d'être activé par la furine exprimée de manière ubiquitaire, permettant invariablement au virus de s'étendre de façon systémique à l'intérieur de l'oiseau, incluant l'infection du système nerveux central (Zambon, 2001). Cette caractéristique a permis de déclencher une grippe mortelle à Hong Kong en 1997. L'analyse du virus influenza H₅N₁, qui a tué au moins six personnes, a montré que seulement deux mutations furent requises pour générer un virus létal – une mutation à l'intérieur d'une sous-unité de l'ARN polymérase PB2 virale a amené à la génération d'un site tandem de la furine à l'intérieur de la jonction de clivage entre HA₁ et HA₂ (-Arg-Glu-Arg-Arg-Arg-Lys-Lys-Arg¹-) (Hatta et al., 2001). La façon exacte que le site tandem de la furine et la mutation de PB2 contribuent à l'augmentation de la virulence de l'influenza H₅N₁, ce qui n'est pas connue présentement. Néanmoins, la propension pour la mutation rapide et pour la vitesse de réassortiment à l'intérieur de l'influenza aviaire et son habilité à sauter directement des oiseaux aux humains soulignent notre vulnérabilité à ce pathogène (Horimoto et Kawaoka, 2001).

L'importance de la furine de la virulence d'un pathogène s'étend à d'autres virus, incluant le virus d'Ebola. Par exemple, les souches hautement pathogéniques de l'Ebola du Zaïre et du Ivory Coast – qui causent une fièvre hémorragique massive et soudaine

(fulminante) qui est caractérisée par un saignement interne et externe massif et qui tue 90% des personnes qui le contractent – contiennent un site consensus de la furine à l'intérieur de leur glycoprotéine de l'enveloppe (GP) (Volchkov et al., 1998). Mais, par opposition, la GP de la souche d'Ebola de Reston relativement moins virulente ne possède pas un site consensus de la furine. Cet isolat n'est pas pathogénique aux humains (Feldmann et al., 1999). Étonnamment, cependant, malgré les similarités structurales apparentes sous-jacentes entre gp160 de VIH-1, HA du virus influenza et la GP du virus d'Ebola, le clivage catalysé par la furine de la GP n'est pas requise pour la fusion membranaire dans les modèles de culture cellulaire (Neumann et al., 2002). L'absence d'une exigence de la maturation de GP pour la fusion membranaire concorde avec la présence d'une séquence de fusion interne dans la GP d'Ebola appartenant au flavivirus (Heinz et al., 2001).

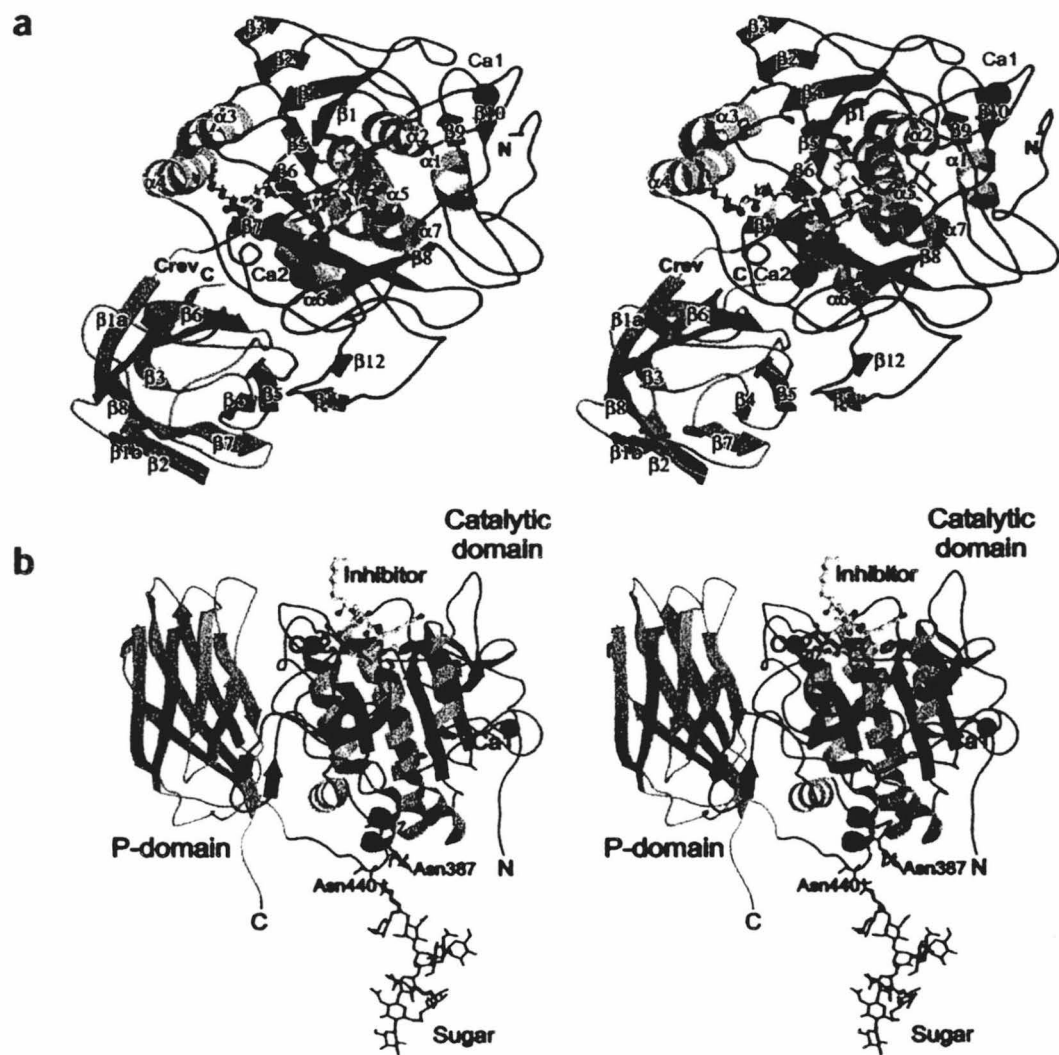
1.2.5. Cristallisation du domaine catalytique-domaine P de la furine

En 2003, le domaine catalytique-P domaine de la furine de souris fut cristallisé et la première parmi les membres de la famille des convertases (Henrich et al., 2003). Les seules solutions de structure déterminées furent le prodomaine de PC1/PC3 résolu par spectroscopie en RMN (Tangrea et al., 2002) et des modèles du domaine catalytique de la furine (Siezen et al., 1994) et du P domaine de PC1/PC3 (Ueda et al., 2003) réalisés d'après la structure de la subtilisine bactérienne et des prédictions de structure secondaire. Or, cette structure cristalline obtenue de la furine de souris comprenant le domaine catalytique et le P domaine qui a l'avantage d'expliquer plus en détail la

fonction potentiel du P domaine, la spécificité étroite du substrat de cette enzyme et les aspects additionnels de fonctionnement. En outre, l'aspect le plus important qu'apporte cette structure comme outillage est de permettre de développer des inhibiteurs spécifiques de la furine.

Comparativement au modèle du domaine catalytique de la furine, la structure cristalline a permis d'éclaircir la structure secondaire et la fonction potentielle du P domaine et de corriger certaines erreurs apportées par le modèle de domaine catalytique (Siezen et al., 1994) par rapport à la structure cristalline. La structure cristalline a révélé que la chaîne polypeptidique est repliée en deux domaines séparés mais attenants : un domaine catalytique sphérique et un domaine P de type tonneau, qui interagissent entre eux par un interface étroit de 1,100 Å² (Figure 15) (Henrich et al., 2003).

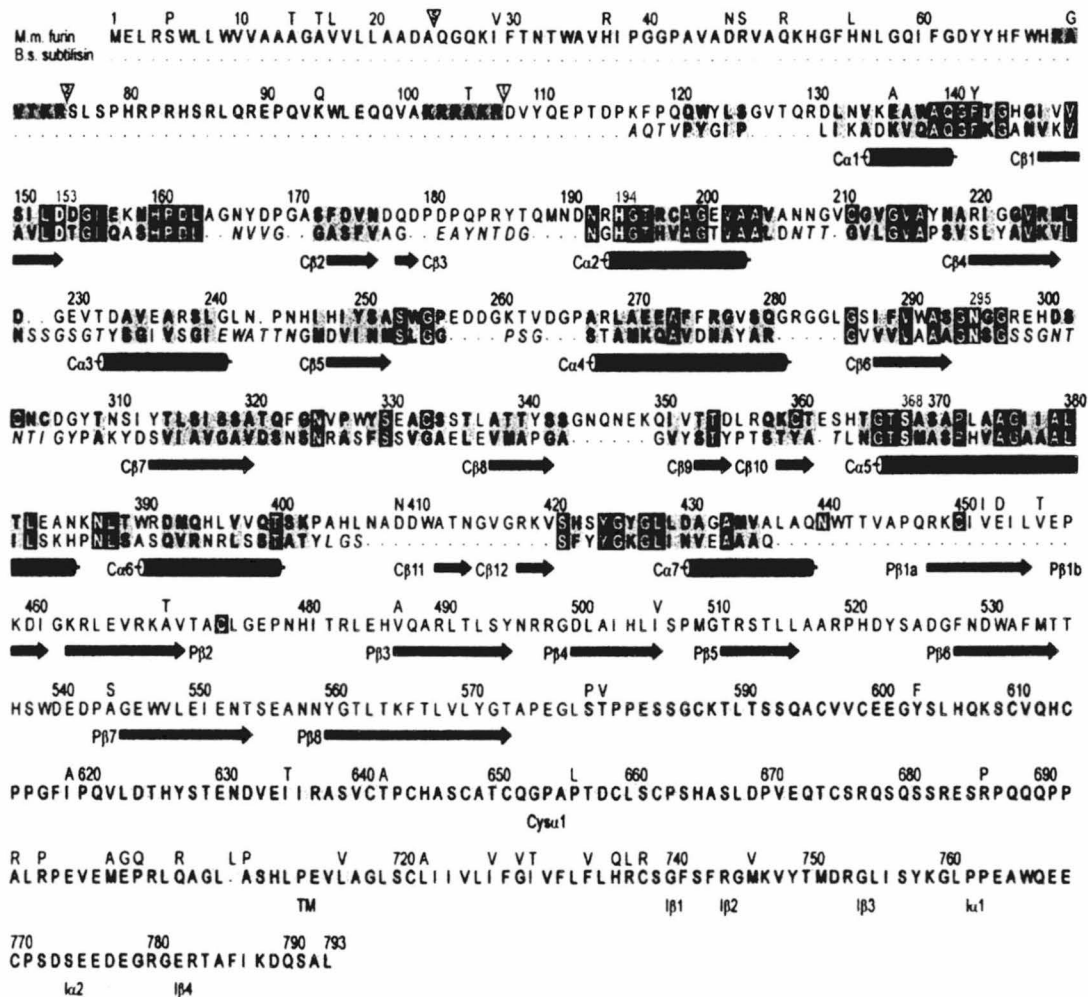
Pour le domaine catalytique de la furine, le corps de ce domaine consiste, similairement à la subtilisine (Siezen et al., 2003; Bode et al., 1987), d'un feuillet β hautement entortillé composé de sept parallèles et un de brins β antiparallèles (C β 1–C β 8, figures 15 et 16), flanqué par cinq hélices α adjacents (C α 2–C α 6) et deux périphériques (C α 1 et C α 7) et par deux boucles β à épingle à cheveux. Le domaine catalytique de la furine est transversalement connecté par des ponts disulfures Cys211-Cys360 et Cys303-Cys333. La furine contient 2 sites internes de liaison pour le calcium (Ca1 et Ca2, Figure 15). Le site de liaison du Ca2 semble stabilisé la pochette S₁. Cependant, la furine ne contient pas d'un «second» site à l'intérieur de la boucle Asp177-Asp181, qui fut anticipé dans le modèle basé sur l'homologie de la thermitase (Siezen et al., 1994).



Thomas, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:753

Figure 15: La structure générale tridimensionnelle de la furine de souris. a) Représentation stéréo en ruban de la furine soluble. Les hélices, les feuillets β et les structures irrégulières du domaine catalytique sont montrés en jaune pour les hélices, en rouge pour les flèches et en bleu foncé pour les feuillets; le P domaine est en bleu pâle. Pour la clarté, les préfixes (C pour catalytique et P pour P domaine) ont été omis à partir des inscriptions de la structure secondaire. Les résidus du site actif (gris foncé) et les résidus de l'inhibiteur dec-RVKR-cmk (modèle en tige et en boule de couleur pâle) sont donnés avec tous les atomes non hydrogènes et les deux ions de calcium liés en sphères rose. La crevasse profonde entre les domaines catalytique et P (Crev) est une importance possible pour le propeptide, la liaison du substrat ou les deux. La vue est vers la fente longeant horizontalement la surface du domaine catalytique. b) Orientation alternative de la représentation de a, montrant plus clairement les oligosaccharides liées par N définies structurellement et le repliement du P domaine. La furine complète est ancrée à la membrane par un prolongement de jonction probablement flexible à partir du bas du P domaine.

Le P domaine est organisé comme un sandwich β de huit brins séparés, d'après des prédictions de la structure secondaire (Ueda et al., 2003). Les brins sont connectés, cependant, comme des barils β enroulés: avec les brins β P β 1a/b-P β 8-P β 3-P β 6 opposant les brins β P β 2-P β 7-P β 4-P β 5 (Figures 15 et 16). La structure proche du baril P suggère que seulement un domaine P complet peut stabiliser la structure de repliement et où elle confère son effet de stabilisation sur le domaine catalytique, ce qui est essentiel à l'activité (Zhou et al., 1998). Les brins P β 5 et P β 6 de «lisière» du domaine P et des boucles C β 5-C α 4, C β 6-C β 7, C β 7-C β 8 et C β 11-C β 12 du large domaine catalytique participe à des contacts interdomaines, régulé par une pièce central en grande partie hydrophobique (Ueda et al., 2003) mais aussi par un nombre d'interactions de pont salin. Le P domaine stabilise probablement le domaine catalytique en protégeant les pièces de la surface du solvant qui sont plus hydrophobique que chez la subtilisine (Figures 15). Ces régions incluent la longue boucle à épingle à cheveux de C β 11-C β 12 aussi bien que plusieurs résidus formant le site de liaison Ca₂, qui stabilise la pochette S₁ (Figures 15 et 17). Toutefois, il y a encore des points à éclaircir à propos du fonctionnement du domaine P sur la régulation de l'activité enzymatique.



Thomas, 2002 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3:753

Figure 16 : Structure primaire de la furine de souris. L'alignement de la séquence d'acides aminés basé sur la structure de la furine de souris (M.m. furine) et de la subtilisine Carlsberg (B.s. subtilisine). Pour la subtilisine, tous les résidus topologiquement non équivalents sont en italiques. Les résidus identiques et similaires sont en rouge et en jaune, respectivement; les résidus cystéines sont en bleu, les résidus du site actif en vert et les deux résidus asparagines glycosylés en rose. Les résidus des sites de la première et de la deuxième activations (les têtes de flèches numérotées) sont montrés avec un fond orange et le site de clivage du peptide signal est indiqué par une tête de flèche marquée avec un S. La numérotation utilisée est pour la furine intacte de souris, avec les quelques substitutions chez l'enzyme humaine au-dessus de la séquence de souris. En-dessous de la séquence, les feuillets β et les hélices sont indiqués par des flèches et des cylindres, montrant en noir comme dérivé expérimentalement pour le domaine catalytique et P, et en gris pâle comme prédit pour la plupart de la chaîne C-terminale. Les résidus de la furine pleine longueur qui ne sont pas visible dans la densité électronique ou non dans la protéine cristallisée sont montrés avec un fond gris.

La crevasse du site actif de la furine diffère considérablement de celle des subtilisines bactériennes, en ce qui concerne la profondeur, la silhouette et les charges du site actif (Henrich et al., 2003). Chez la furine, c'est une crevasse, entourée par la boucle C β 2-C α 2 et le segment de surface C β 4-C α 3 d'un côté et par les boucles C β 5-C α 4, C β 6-C β 7 et C β 7-C β 8 de l'autre côté, avec la triade du site actif Ser368-His194-Asp153 disposé au centre (Figures 15 et 17). La structure cristalline du site actif de la furine montre exactement la disposition tridimensionnelle des pochettes de liaison du site actif et explique les exigences restrictives de la spécificité du substrat de la furine. La pochette du sous-site S₁ dans laquelle la chaîne latérale de l'arginine P₁ s'insère est repliée d'une manière plus similaire à la pochette S₁ de la trypsine que de la subtilisine (Figures 17). Les éléments qui entourent cette pochette expliquent la restriction imposée au substrat de posséder un arginine en P₁ (Nakayama, 1997; Rockwell et al., 2002; Jean et al., 1995). La géométrie et la charge du sous-site S₂ dans laquelle la chaîne latérale de la lysine P₂ s'allonge à l'intérieur de cette crevasse sont plus avantageux et bénéfiques pour s'accommoder de la lysine, mais n'exclut pas une chaîne latérale de l'arginine en P₂ (Figure 17). La pochette du sous-site S₃ est largement exposée au solvant, ce qui est en accord avec le manque de préférence de ce site. Cependant, les chaînes latérales alcalines des résidus P₃ pourraient favoriser les contacts avec les éléments disposés à la surface de cette pochette, ce qui est en accord avec la présence fréquente de résidus alcalines en P₃ des substrats *in vivo* de la furine (Rockwell et al., 2002). La pochette du sous-site S₄ dans laquelle la chaîne latérale de l'arginine P₄ s'insère est repliée d'une manière à que les éléments formant géométriquement ce site de liaison forme une structure complémentaire

favorisant une meilleure adaptation pour la chaîne latérale de l'arginine en P₄. Ce qui est en accord avec la forte préférence pour les résidus arginines et la faible préférence pour les résidus lysines en P₄ (Rockwell et al., 2002). Toutefois, le sous-site S₄ permet aussi d'être occupé par d'autres résidus (Figures 17 et 18).

Pour les interactions ou les liaisons du substrat en dehors du site actif, les éléments du sous-site S₆ permettent d'intercaler un résidu alcalin, dans le cas, où les résidus P₄ sont petits, ce qui compense l'absence d'une arginine en P₄ du substrat dans sa reconnaissance par la furine (Figure 18). Cette idée est en accord avec l'observation que la majorité des substrats de la furine possèdent des résidus alcalins en P₄ ou en P₆ (Nakayama, 1997; Rockwell et al., 2002). Le sous-site S₁' chargé positivement semble être conçu préférentiellement pour l'accommodation de chaînes latérales P₁' chargées négativement ou polaires et S₂' pour des résidus hydrophobiques de taille moyenne (Figure 18), en accord avec l'absence requise de résidus lysines en P₁' et P₂' (Nakayama, 1997; Rockwell et al., 2002; Zhou et al., 1998; Fugère et al., 2002b; Dufour et al., 1998). Le ciblage des substrats est dominé par les interactions électrostatiques étendues en passant par 18 groupes de résidus chargés négativement autour de la région de liaison sans apostrophe de la furine (Siezen et al., 1994). Alors que les sous-sites S₁, S₂ et S₄ sont conçus spécialement pour accommoder les résidus arginines et lysines, les résidus P₃, P₅ et P₆ (également P₇ et P₈) comprennent principalement une surface négative potentiel, en conformité avec la préférence de la furine pour des peptides polybasiques (Cameron et al., 2000).

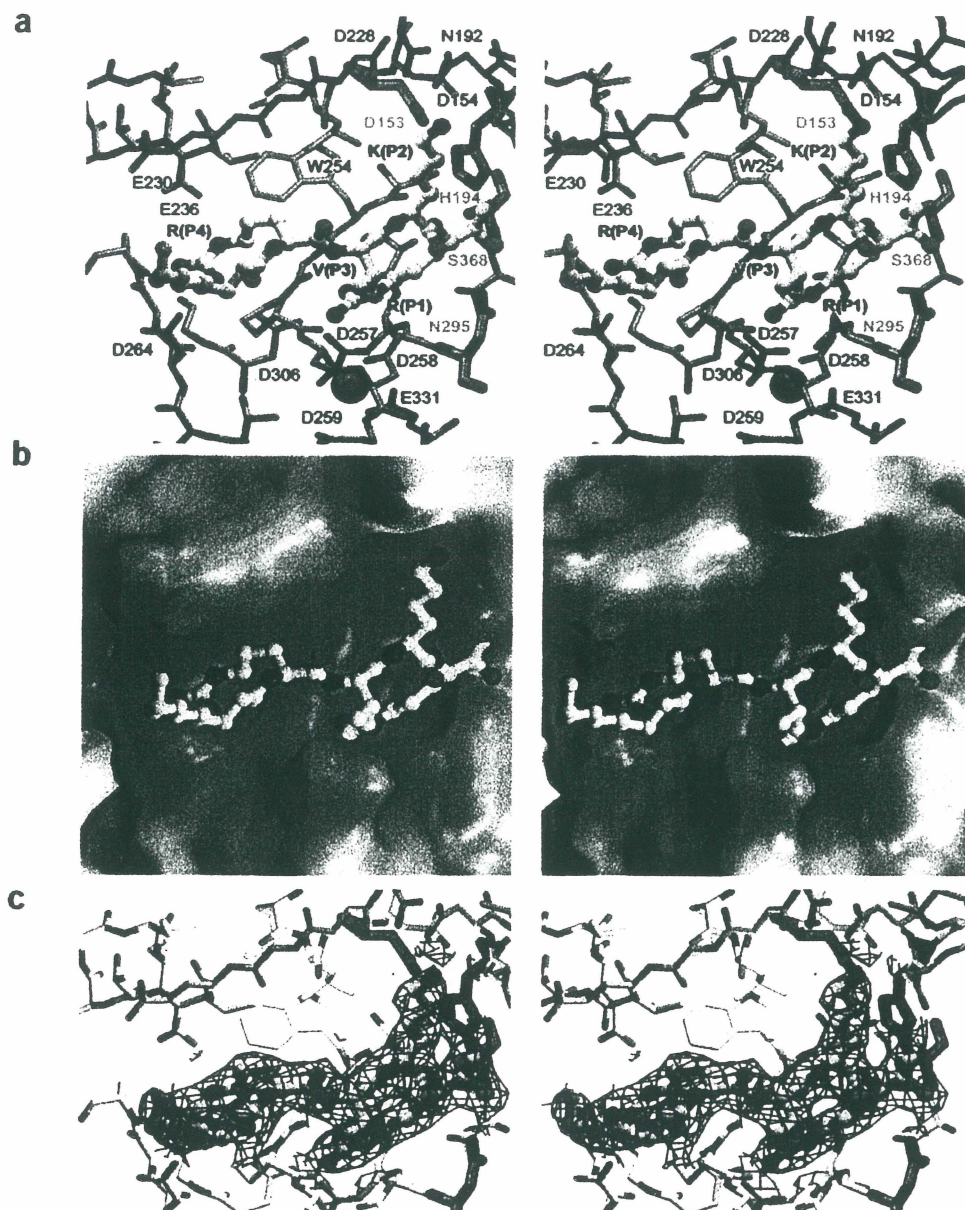


Figure 17: Les interactions entre l'inhibiteur et la fente du site actif. La vue en stéréo vers la région du site actif de la furine et de l'inhibiteur dec-RVKR-cmk (orientation est similaire à celle de la Figure 19a). a) Le modèle en tige des résidus entourant (les carbones en gris foncé, les azotes en bleu et les oxygènes en rouge), montré ensemble avec l'inhibiteur (le modèle en tige et en boule de couleur grise) et le calcium 2 (sphère violette). Les quatre chaînes latérales de l'inhibiteur, les résidus du site actif et les résidus acides donnant lieu à un potentiel électrostatique négatif des sous-sites S₁-S₄ sont marqués. b) L'inhibiteur (le modèle en tige et en boule) est montré en avant de la surface solide du domaine catalytique, colorée selon son potentiel de surface électrostatique négatif (rouge, -27 e kT⁻¹) et positif (bleu, 27 e kT⁻¹). c) Le modèle en tige est similaire à a, mais avec l'inhibiteur dec-RVKR-cmk est superposé avec une carte de la densité électronique (bleu) de $2 F_o - F_c$ contournée à 1σ .

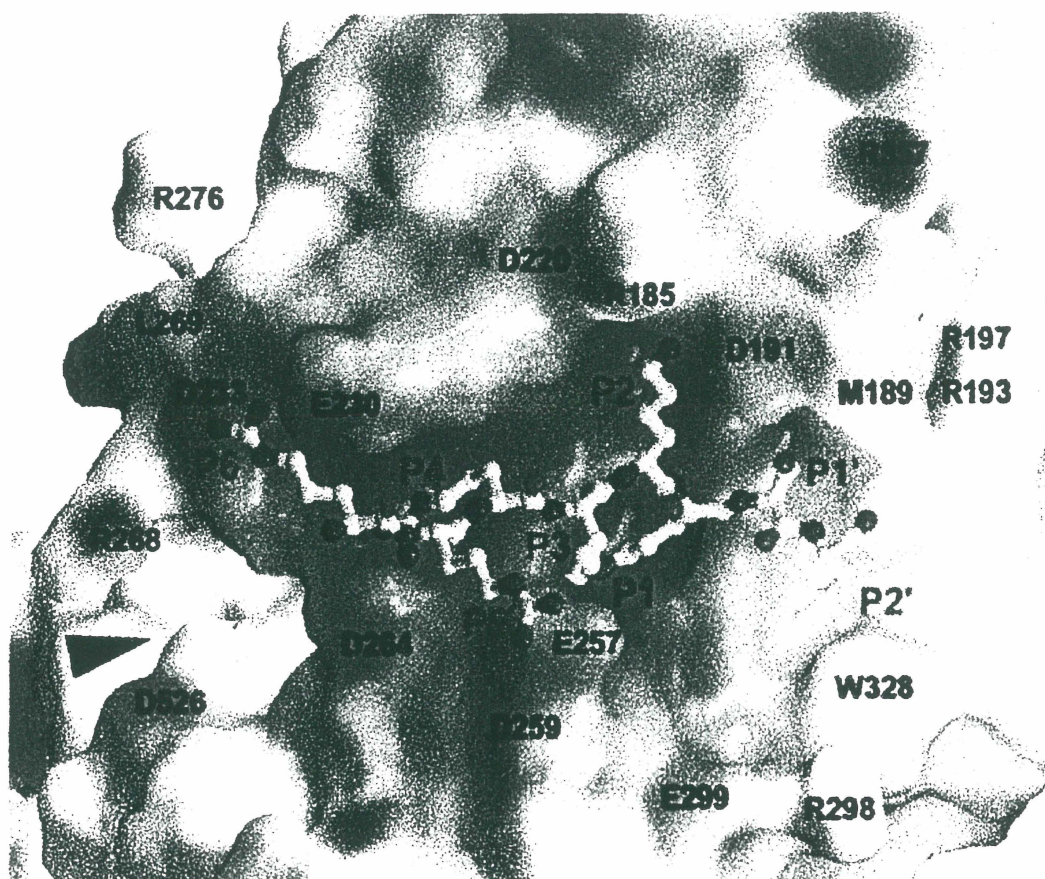


Figure 18 : Un modèle de l'interaction du substrat avec la furine. La représentation de la surface solide de la fente prolongée du site actif de la furine de souris, montré ensemble avec une chaîne du substrat Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-↓-Ser-Leu provisoirement modélisée dans les sous-sites de S_6 à S'_2 basés sur l'inhibiteur expérimental de l'eglin C (Bode et al., 1987) et le complexe prodomaine-subtilisine (Gallagher et al., 1995). En bas à gauche, l'entrée de la crevasse formée entre le domaine catalytique et P est indiquée par une tête de flèche. La surface a été colorée d'après le potentiel de surface électrostatique du domaine catalytique. L'orientation est comme les autres figures. *Thomas, 2002 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3:753*

1.3. RATIONNELLE DE L'ÉTUDE

La furine joue un rôle très important dans plusieurs processus biologiques (comme le développement du fœtus, des os, de la signalisation protéolytique cellulaire) et pathologiques (comme le cancer). En outre, elle est impliquée dans la maturation protéolytique des divers précurseurs protéiques de plusieurs agents pathogènes infectieux (virus et bactéries). Présentement, il n'existe pas d'inhibiteurs ou d'agents antiprotéolytiques naturels connus contre l'activité enzymatique de la furine. D'abord, nous avons examiné le mécanisme d'inhibition par lequel AT-PDX inhibe la furine. Ensuite, À partir d'inhibiteurs de sérine protéase existantes, comme les inhibiteurs protéiques de type serpine, nous avons conçu et développé des variants dans lesquels nous avons introduit différents sites de reconnaissance de la furine à l'intérieur du RSL de l' α_1 -antitrypsine, afin d'augmenter l'affinité d'interaction de l'inhibiteur envers la furine. De plus, nous avons évalué le comportement biochimique et moléculaire d'inhibition de chacun des variants de patron de reconnaissance différent *in vitro* et *in cellulo*, d'après le mécanisme d'inhibition du substrat-suicide typique des serpinines.

La furine est une enzyme de maturation qui réside et qui clive la plupart de ses substrats au *trans*-Golgi. Toutefois, plusieurs études ont déterminé qu'elle a la possibilité de maturer plusieurs substrats protéiques dans différents compartiments cellulaires (endosomes et surface cellulaire). Chaque compartiment cellulaire possède un environnement acide ou basique. Ces environnements physico-chimiques pourraient réguler l'activité enzymatique de la furine en fonction du motif de reconnaissance présent

dans la séquence de clivage, comme a été montré pour son autoactivation protéolytique à partir du RE vers le TGN (Anderson et al., 2002). Une étude a rapporté que les réactions d'inhibition de l' α_1 -antitrypsine et l' α_1 -antichymotrypsine envers la chymase, à différents pH, possédaient des comportements inhibiteurs, des cinétiques d'inhibition et des propriétés physico-chimiques opposés l'une à l'autre (Schechter et al., 1997). Avec des variants structuraux de l' α_1 -antitrypsine et l' α_1 -antichymotrypsine dans lesquels nous avons introduit divers motifs de reconnaissance de la furine, nous avons examiné l'influence du pH sur son activité enzymatique avec un substrat donné et sur la cinétique et moléculaire d'inhibition des différent variants envers la furine. De plus, nous avons évalué le caractère inhibiteur des motifs de reconnaissance de chacun des variants *in vitro* et *in cellulo*.

En collaboration avec le laboratoire du Dr. André Cantin, nous avons comparé la stabilité et l'indice de protection contre l'hémorragie alvéolaire provoquée l'élastase leucocytaire de l' α_1 -antitrypsine non-glycosylée et glycosylée dans les compartiments vasculaires (administré par intraveineuse) et pulmonaires (administré par aérosol). Étant donné qu'il faut soutenir en permanence la suppression de l'activité élastase leucocytaire dans les poumons des personnes atteintes d'emphysème héréditaire et d'autres maladies pulmonaires, l'administration d' α_1 -antitrypsine doit être donnée fréquemment et en grande quantité. Afin d'augmenter la stabilité et de prolonger la durée de la demie-vie de l' α_1 -antitrypsine recombinante dans le sang et les poumons par rapport à l' α_1 -antitrypsine glycosylée humaine, nous avons trouvé une méthode de glycosylation qui permet de conjuguer des molécules de PEG (polyéthylène glycol) sur la seule cystéine de la serpine.

De plus, nous avons examiné son indice de protection contre l'hémorragie pulmonaire causée par l'élastase leucocytaire.

Ces travaux de recherche, qui portent sur l'étude d'une méthode alternative des traitements thérapeutiques à l' α_1 -antitrypsine humaine pour les patients atteints de désordres pulmonaires, pourront aussi servir comme plan d'architecture aux agents antiprotéolytiques contre l'activité enzymatique de la furine. Or, certaines pathologies pulmonaires, par exemple l'emphysème et la fibrose kystique, sont aggravées par des pathogènes opportunistes, i.e. qu'ils profitent déjà de l'état affaibli de l'organisme pour s'implanter et croître, ce qui augmente l'état d'aggravation et de morbidité de la maladie. De plus, pour certaines bactéries pathogènes opportunistes, comme *Pseudomonas aeruginosa*, utilisent la furine de l'hôte comme outil d'activation protéolytique de leurs protoxines afin de pénétrer dans la cellule et la lyser pour prendre les nutriments nécessaires à sa croissance. Avec le développement d'agents antiprotéolytiques efficaces contre les méfaits de l'activité enzymatique de la furine et de l'élastase, nous pourrions envisager un soulagement et un prolongement de la vie de ces patients atteints de maladies pulmonaires. Aussi, ces recherches de base sur les agents anti-furine pourront avoir des applications contre les infections bactériennes et virales dans lesquelles la furine a un rôle crucial dans le caractère virulent de ces agents pathogènes.

1^{er} article

**Serpin-like properties of α_1 -antitrypsin Portland towards furin
convertase**

**Erick K. Dufour, Jean-Bernard Denault, Paul C.R. Hopkins,
Richard Leduc**

FEBS Letters No.426 (1998) pp.41-46

2^{ème} article**The Contribution of Arginine Residues within the P6-P1
Region of α_1 -Antitrypsin to Its Reaction with Furin**

**Erick K. Dufour, Jean-Bernard Denault, Lyne Bissonnette,
Paul C.R. Hopkins, Pierre Lavigne, Richard Leduc.**

**THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 276, NO. 42, October 19, pp. 38971-38979, 2001**

3^{ième} article

**Stabilité des complexes serpins variantes-furine : dépendance
au pH et régulation de l'étape de déacylation**

**Stability of mutant serpin/furin complexes: dependence on pH and regulation
at the deacylation step**

Erick K. Dufour, Antoine Désilets, Jean-Michel Longpré and Richard Leduc*

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, Canada, J1H 5N4

Running title: Mechanism of furin inhibition by serpin mutants

* Corresponding author:
Richard Leduc, Ph.D.
Department of Pharmacology
Faculty of Medicine
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec
Canada J1H 5N4
Tel.: (819) 564-5413
Fax: (819) 564-5400
E-mail: Richard.Leduc@USherbrooke.ca

SYNOPSIS

Furin proteolytically cleaves a wide variety of proprotein substrates mainly within the *trans*-Golgi network (TGN) but also at the cell membrane and in endosomal compartments where pH is more acidic. Incorporation of furin recognition sequences within the reactive site loop (RSL) of α_1 -antitrypsin (AT) leads to the production of furin inhibitors. In an attempt to design more stable, potent and specific serpin-based inhibitors, we constructed a series of AT and α_1 -antichymotrypsin (ACT) mutants by modifying the P₇-P₁ region of their RSLs. The biochemical properties of these variants were assessed by evaluating their propensity to establish SDS-resistant complexes with furin in a variety of conditions (pH 6.0-9.0) and by measuring their association rate constants. The effect of pH during the initial steps of complex formation was minimal, suggesting that the acylation step is not rate-limiting. The decrease in stoichiometry of inhibition (SI) values observed in AT variants at high pHs was a result of the reduced pH-dependent deacylation rate, which is rate-limiting in this mechanism and which suggests increased complex stability. Conversely, the SI values for ACT mutants had a tendency to be lower at acidic pH. Transiently transfecting hEK293 cells with these mutants abolished processing of the pro-von Willebrand factor precursor but, interestingly, only the ACT variants were secreted in the media as uncleaved forms. Our results suggest that re-engineering the reactive-site loops of serpins to accommodate and target furin or other serine proteases must take into account the intrinsic physico-chemical properties of the serpin.

Keywords: furin; serpin mechanism; convertases; serine proteases; α_1 -antitrypsin; α_1 -antichymotrypsin; protease inhibitors

INTRODUCTION

Proteolytic processing is a ubiquitous mechanism for the production of biologically active polypeptides. A wide variety of precursors or proproteins of serum proteins, hormones, growth factors, cell surface receptors, extracellular matrix proteins, bacterial toxins, and viral coat proteins must undergo proteolytic cleavage in the exocytic and endocytic pathways to liberate their active moieties. Evidence accumulated over the past 15 years suggests that this event involves a family of calcium-dependent serine proteases called subtilisin-like proprotein convertases (Steiner 1998; Bergeron et al. 2000). Among the seven members of this family, furin has been the most thoroughly studied (Thomas 2002). Furin is a ubiquitously expressed enzyme that processes precursor molecules within the trans-Golgi network/endosomal system. The wide variety of proproteins cleaved by this protease highlight its crucial role in numerous cellular and pathological events.

The initial characterization of the enzymatic signature of furin spearheaded efforts to design compounds aimed at inhibiting this convertase. One of the particularities of the specificity of furin is the requirement for arginine both at the P₁ and P₄ sites of the scissile bond, Arg-Xaa-Xaa-Arg↓, which forms the minimal recognition site of the enzyme (Molloy et al. 1992; Watanabe et al. 1992). With the recent elucidation of the crystal structure of mouse furin (Henrich et al. 2003), it has become clear how specific acidic residues forming the S₁ and S₄ subsites within the catalytic pocket interact with the basic residues at the P₁ and P₄ positions of substrates, thus influencing their affinity for the enzyme. Taken together, these data form the starting point for the design of furin inhibitor compounds. Many reports have demonstrated how a variety of templates ranging from simple polyarginine compounds to engineered eglin C proteins can inhibit furin (Anglikier 1995; Boudreault et al. 1998; Lazure et al. 1998; Cameron et al. 2000; Komiyama and Fuller 2000; Komiyama et al. 2003).

Another class of inhibitors, serpins (serine protease inhibitors), are naturally occurring proteins that play a vital role in the regulation of serine protease activity (Gettins 2002). Serpins function by initially binding to the catalytic pocket of the target enzyme through their reactive site loop (RSL). The recognition of the serpin by the protease is largely attributed to the P₁-P₁' bond of the RSL, but other determinants are also involved. Subsequent to the binding of the serpin to its protease, it is proposed that a refolding step occurs during which the RSL is inserted into the center of β -sheet A of the serpin to form a highly stable and kinetically trapped covalent serpin-protease complex. The solved crystallographic structure of the α_1 -antitrypsin-trypsin complex illustrates, at the atomic level, how this refolding step occurs (Huntington et al. 2000).

Furin is the prototype for mammalian proprotein processing convertases (Siezen et al. 1994; Henrich et al. 2003), which follows the serine protease mechanism of utilizing the archetypal catalytic triad of serine, histidine, and aspartate. These proteases also have a fourth conserved catalytic residue, the so-called oxyanion hole asparagine, which acts as a hydrogen bond donor to stabilize the build-up of negative charges on the scissile carbonyl during the transition state (Siezen and Leunissen 1997). Specific proteolytic autoactivation of furin is pH-dependent (Thomas 2002). However, the importance of the pH effect on the proteolytic maturation of furin substrates, activity catalysis, and inhibition is an unknown factor with regard to the overall enzymatic signature of furin. In the present study, we focused on the properties of various AT and ACT mutants in furin inhibition. The results revealed the dynamics and mechanisms of furin-serpin complex formation at different pHs.

EXPERIMENTAL

Materials- DNA modification enzymes were from New England Biolab (Beverly, MA, USA). Culture reagents were from Invitrogen Corp. (Burlington, ON, Canada). *E. coli* strains BL21 and BL21(DE3)pLysS and the pET-32a expression vector were from Novagen (San Diego, CA, USA). Human AT and ACT cDNAs were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The pQE-31 expression vector, Ni²⁺-nitriloacetic acid affinity resin, and anti-His₅ antibodies were from Qiagen (Santa Clarita, CA USA). Fluorogenic substrates, boc-Arg-Val-Arg-Arg-4-methyl-7-amidocoumarin (boc-RVRR-MAC), and decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (dec-RVKR-CH₂Cl) were from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA). Monoclonal anti-hfurin antibodies (MON-152) were from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). AT-PDX and AT-Pittsburgh cDNAs were a generous gift from Dr. Gary Thomas (Vollum Institute, OR, USA) and Hedral Corp. (Portland, OR, USA). Pro-vWF cDNA was from the Sanquin Blood Supply Foundation (Amsterdam, The Netherlands). Anti-vWF and anti- α_1 -antichymotrypsin polyclonal antibodies were from Dako Diagnostics Canada Inc. (Mississauga, ON, Canada). Anti- α_1 -antitrypsin polyclonal antibody was from Novocastra Laboratories Ltd. (Newcastle, UK).

Cell culture- Human embryonic kidney hEK293 and hEK293-C4 cells, a stable cell line overexpressing human furin (Denault 2000; Denault et al. 2002), were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin.

Site-directed mutagenesis- The construction of AT mutants has been described previously (Dufour et al. 2001). ACT mutants with their signal peptide removed were produced by PCR and inserted into the BamHI/HindIII site of pCR2.1 vector (Invitrogen) before being subcloned into

the prokaryotic expression pET-32a vector. ACT variants were produced as thioredoxin fusion proteins.

Construction, expression and purification of the wild-type and AT and ACT variants - The expression of AT variants in pQE-31 has been described previously (Dufour et al. 1998; Dufour et al. 2001). For the ACT variants, purification of the native proteins was essentially the same as for the AT variants, with slight modifications. All purification steps were carried out at 4°C. The *E. coli* BL21 (AT variants) or BL21(DE3)pLysS (ACT variants) cells were grown at 30°C in TB medium containing 50 µg/ml carbenicillin to an $A_{600} = 0.8$ for AT variants and in TB containing 50 µg/ml carbenicillin and 34 µg/ml chloramphenicol to an $A_{600} = 0.4$ for ACT variants. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside was then added to a final concentration of 1 mM and 200 µM for the induction of AT and ACT variants respectively followed by a 4.5 to 5 h incubation. Cells (0.5–1.0 litres) were harvested by centrifugation and resuspended in 10% of the initial volume in S buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 15 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 500 µl of protease inhibitor cocktail solution, and 1 mM EDTA) containing 1 mg/ml of lysozyme for 30 min. Lysate was then sonicated (4 X 20 sec pulses) on ice. Cell debris were removed by centrifugation at 11,000 X g for 25 min. Ni²⁺-nitriloacetic acid resin equilibrated with S buffer was added to the supernatant. The slurry was stirred overnight, washed twice with W buffer (50 mM sodium phosphate, pH 6.5, 1.5 M NaCl, 5% glycerol, 5% ethanol, 20 mM imidazole, 15 mM β-mercaptoethanol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), and bound proteins were eluted with E buffer (50 mM sodium phosphate, pH 6.5, 300 mM KCl, 5% glycerol, 250 mM imidazole, and 500 µl of a protease inhibitor cocktail). Fractions containing recombinant proteins were desalted using PD-10 columns (Amersham Bioscience) or Amicon Ultra-15 concentrators (Millipore) in enterokinase buffer (20

mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, and 2 mM CaCl_2). The thioredoxin portion of the ACT variants was removed by digestion with 5 U enterokinase (New England Biolab) for 16 h at room temperature. Further purification of serpin variants was achieved by Mono-Q HR anion exchange. Protein concentrations were determined by Bradford assay using bovine serum albumin as standard. All preparations were quantified by densitometry using SYPRO ruby (Bio-Rad) stained SDS-PAGE gels.

For expression in HEK-293 cells, wild-type ACT cDNA (obtained from ATCC) was first sub-cloned from pBR322 into pST-Blue1 AccepTor (Novagen) before being introduced into the BamHI-EcoRI site of pcDNA3.0 (Invitrogen). ACT variants were then produced by site-directed PCR mutagenesis.

General kinetic methods- Human furin (hfur/714, a soluble form of the enzyme) was expressed and purified as described previously (Denault et al. 2000). The concentration of catalytically active hfur/714 was determined by titration with the active site-directed irreversible inhibitor dec-RVKR-cmk as described (Jean et al. 1998). Enzymatic activity was determined by the cleavage of the fluorogenic substrate boc-RVRR-MAC (excitation: 370 nm, emission: 441 nm). All enzymatic assays were carried out in 100 mM Hepes, pH 7.5, containing 1 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoethanol, and 500 $\mu\text{g/ml}$ BSA. To measure the pH dependence of the SI and k_{ass} parameters, the enzymatic assays were performed with the same buffer composition which was adjusted over a pH range of 6.0 to 9.0. The data obtained at pH 6.0 to 9.0 were fitted to the hyperbolic Michaelis-Menten rate equation to determine values of K_m , k_{cat} and V_{max} for the substrate boc-RVRR-MAC.

Determination of the stoichiometry of inhibition- hfur/714 was used to determine the molar ratio of the AT and ACT variants needed for complete inhibition of the enzyme. The stoichiometry of inhibition (SI) values for the inhibition of hfur/714 were determined by

incubating AT and ACT variants at different concentrations and pH in a total volume of 300 μ l at 37°C with a fixed concentration of hfur/714 for 1 h. The residual amidolytic activity was determined by the addition of 100 μ M boc-RVRR-MAC and the reactions were stopped by the addition of 5 mM EDTA with a 1 h incubation. The residual activity fraction of substrate hydrolysis was plotted as a function of inhibitor concentration. The amount of inhibitor required to completely inhibit the enzyme was calculated by nonlinear regression fitting with a tight-binding titration equation:

$$v_i/v_o = 1 - ([E]_o + [I]_o + K_i) - \{([E]_o + [I]_o + K_i)^2 - 4 [E]_o [I]_o\}^{1/2} / 2 [E]_o \quad (\text{Eq. 1})$$

The SI was determined by regression analysis of the dependence of residual furin activity on $[I]_o/[E]_o$ or by $SI = [I]_o/[E]_o$.

Slow tight binding inhibition kinetics- Slow tight binding inhibition experiments were conducted under pseudo-first order conditions. Each assay consisted of four to eleven reactions with varying amounts of serpin and a control reaction without inhibitor. The assays were started by the addition of a constant amount of enzyme (800 pM) to a solution containing the fluorogenic substrate (200 μ M) and an appropriate inhibitor concentration in kinetic buffer with a pH ranging from 6.0 to 9.0. Progress curves were obtained with the following final concentrations of reactants: 800 pM hfur/714; 200 μ M Boc-RVRR-MAC; 3–30 nM AT-PDX, AT-EK1, AT-EK5, and ACT-EK2 at pHs 6.0 to 9.0; 40–280 nM AT-EK2 at pHs 6.0 to 7.0; 20–180 nM AT-EK2 at pHs 8.0; 5–60 nM AT-EK2 at pH 9.0; 30–150 nM AT-EK3 at pHs 6.0 to 9.0; 10–100 nM AT-EK4 at pHs 6.0 to 9.0; 20–200 nM ACT-EK3 at pHs 6.0 to 7.0; 50–260 nM ACT-EK3 at pHs 8.0 to 9.0; and 250–600 nM ACT-EK5 at pHs 6.0 to 9.0. The duration of the inhibition reactions by progress curve kinetics was 100 min. Spontaneous substrate hydrolysis was measured in separate experiments. The background rate of substrate hydrolysis in the absence of enzyme was subtracted from the data prior to estimating the rate constants. Considering an irreversible

reaction ($v_s = 0$, $k_{diss} = 0$) for each serpin variant, the collected data were determined by fitting to the integrated rate equation for slow tight binding inhibition (Bieth 1995).

$$P = v_s t + (v_o - v_s) \frac{1 - e^{-k' t}}{k'} \quad (\text{Eq. 2})$$

The data were fitted by nonlinear regression using Enzfitter (Biosoft, Ferguson, MO, USA) to obtain values for the initial velocity (v_o), the steady-state velocity (v_s), and the apparent first order rate constant (k') for the establishment of the steady-state equilibrium of the protease-inhibitor complex. A second order rate constant (k^*) was determined by plotting a series of k' versus the respective inhibitor concentration and measuring the slope of the line ($k^* = \Delta k' / \Delta [I]$). Since the inhibitor was competing with the substrate, the second order rate constant k_{ass} was corrected for the substrate concentration and the K_M of hfur/714 for the substrate at different pHs (pH 6.0 = 86 μM ; pH 7.0 = 44 μM ; pH 8.0 = 20 μM ; pH 9.0 = 19 μM) in order to calculate the k_{ass} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). This relationship is $k_{ass} = k^* \times (1 + [S]/K_M)$.

Analysis of complex formation by SDS-PAGE- The ability of AT and ACT variants to form SDS-stable complexes with hfur/714 at different pH values was assessed by incubating 30–150 nM AT-PDX, AT-EK1, AT-EK5, and ACT-EK2, 500 nM–2 μM AT-EK2 and AT-EK3, 150–200 nM AT-EK4, and 350 nM–1 μM ACT-EK3 and ACT-EK5 with hfur/714 (30 nM) in 180 μl of modified kinetic buffer containing 20 $\mu\text{g/ml}$ BSA for 20 min at 37°C. The reactions were stopped with 5 mM EDTA, and the reaction mixtures were lyophilized and then boiled in Laemmli buffer under reducing conditions. Proteins were separated on 8% or 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes, which were then blocked with 5% non-fat dry milk in TBS. Western blotting was performed using anti-hfur/714 (MON-152), anti- α_1 -antichymotrypsin, or anti-pentaHis antibodies to detect the complexes, hfur/714, ACT, and His-

tagged proteins, respectively. The membranes were developed using the Lightning protocol (Perkins Elmer Life Sciences).

Immunoprecipitations- hEK293 and hEK293-C4 cells were transfected with 4 μ g of pro-vWF cDNA or co-transfected with 0.5 μ g or 4 μ g of serpin variant cDNAs using Fugene 6 (Roche Corp.) in 6 cm plates. Twenty-four hours post-transfection, cells were washed with PBS and metabolically labelled in Met⁻/Cys⁻ minimum essential medium containing 10% dialyzed FBS and 75 μ Ci [³⁵S]Met/Cys (Express³⁵S³⁵S labelling mix; Perkin-Elmer Life Sciences) for 4 h. Media were harvested and divided into three equal parts for incubation either with anti-vWF (1:500), anti- α_1 -antichymotrypsin (1:500), anti- α_1 -antitrypsin (1:500), or M2 anti-FLAG (for detection of furin at 1:500) followed by protein A/G-agarose. The immunoprecipitates were resolved on a 7% SDS-PAGE gel for vWF, an 8% SDS-PAGE gel for hfur/714, and a 10% SDS-PAGE gel for serpin variants.

RESULTS

Production of AT and ACT variants- In order to examine the inhibitory properties of serpin variants toward human furin, we designed, constructed, expressed, and purified a series of AT and ACT mutants incorporating a variety of furin recognition sequences within their RSL (Figure 1). The AT variants were produced as polyhistidine (N-terminal) fusion proteins (Dufour et al. 2001), while ACT variants were expressed as thioredoxin fusion proteins. For ACT, we found that these conditions reduced protein degradation and increased the solubility of the expressed proteins. All variants were produced as soluble proteins and were purified under native conditions from total cytoplasmic proteins by either a two-step procedure (AT variants) using nickel affinity column chromatography and MonoQ ion exchange chromatography or a three-step procedure (ACT variants) consisting of an additional enterokinase digestion step for the removal of the thioredoxin moiety. Fig. 2A shows that the purified recombinant wild-type and AT variants migrated as 47 kDa proteins, whereas the purified recombinant wild-type and ACT variants migrated as 42 kDa proteins (Figure 2B). All purified serpins were estimated to be > 90% pure by densitometric analysis.

Influence of pH on the stoichiometry of furin inhibition by AT and ACT variants- We evaluated the SI for each AT and ACT variants by titration experiments. Active-site titration of furin was determined using the active site-directed irreversible inhibitor dec-RVKR-cmk. Serpins are mechanism-based inhibitors and follow a branched reaction pathway (Scheme 1). According to this mechanism, serpin inhibitory activity is affected by the ratio of the rate constant for the substrate pathway (k_3), which generates cleaved, uncomplexed serpin (I^*), and the rate constant for the inhibitory pathway (k_4), which generates the stable serpin-enzyme complex (EI^*). This ratio is reflected in the stoichiometry of inhibition, SI [$SI = 1 + k_3/k_4$]. The SI value indicates the “efficiency” of a serpin for a given protease, which equals the number of moles of inhibitor

required to completely inhibit 1 mol of a target protease. For cognate serpin-protease complexes such as AT-elastase, the reaction flows almost entirely toward stable complex formation, resulting in SI values close to 1 (Hopkins and Stone 1995). Table I shows the pH effect on the SI values of AT and ACT variants towards furin. For all AT variants we observed a decrease in SI as a function of an increase in pH. Three variants (AT-EK2, AT-EK3 and AT-EK4) had very high SI values in all pH conditions, indicating that the reaction flow for these serpins partitioned to the pathway generating the cleaved form (k_3). However, this behaviour changed dramatically when more basic pH conditions were used, as can be seen when SI values of >200 for AT-EK2 at pH 6.0 were reduced to 46 at pH 9.0. Lower SI values were obtained with AT-PDX, AT-EK1, and AT-EK5, with the most efficient variant being AT-EK5 at basic pHs (SI of 1.5).

In contrast, the SI of ACT variants decreased as the pH shifted to more acidic values. Indeed, the SI of ACT-EK2, which reconstitutes a typical furin recognition motif (RTRR), shifted from 4.7 at pH 9.0 to 2.7 at pH 6.0. Replacing Arg by Lys at the P₂ position, which yielded ACT-EK3, significantly increased the SI (2.7 to 13 at pH 7.0), which is similar to the shift observed for the AT homolog. Interestingly, the EK5 homologs of AT and ACT behaved quite differently. ACT-EK5 had very high SI values (>200) while AT-EK5, as previously mentioned, had an SI of 1.5 at pH 9.0. This is likely the result of the effect of the P₅ residue, which is a glutamate in AT and a lysine in ACT.

Influence of pH on k_{ass} - We next examined whether the AT and ACT variants possessed the time- and concentration-dependent characteristics of serpins, namely slow tight-binding inhibition kinetics at various pHs. Reaction kinetic curves for all variants were performed under conditions where $I_0 \geq SI \times E_0$, such that the effect of the cleavage pathway on k_{ass} could be ignored (Waley 1985). All AT and ACT variants tested had slow tight-binding inhibition kinetic behaviours (data not shown) (Hopkins and Stone 1995; Dufour et al. 2001). Table II shows the

effect of pH on k_{ass} , k'_{ass} of each AT and ACT variant in reaction with furin. In serpin-protease reactions with an $\text{SI} > 1$, consumption of the inhibitor by hydrolysis may influence the magnitude of k_{ass} (Djie et al. 1996). Therefore a change in SI could thus confound the interpretation of the pH effect on the inhibition pathway. Considering the k'_{ass} ($k_{\text{ass}} \times \text{SI}$) therefore represents the true second order rate constant of the formation of the covalent acyl-enzyme intermediate (EI') (Scheme 1) and is a way of normalizing inhibition rate constants for comparative purposes when the mechanism suggests such an adjustment is warranted. Indeed, we observed that the association rates for each AT or ACT variant were not greatly influenced by pH, with k'_{ass} values between 10^5 and $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. The lower values obtained ($5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) were for ACT-EK3 at pH 9.0 with the highest association rates ($1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) for AT-EK2 at pH 9.0. These results demonstrate that, in general, the association rate with furin of the various mutants is primarily a function of the inhibitory pathway and is not significantly related to a change in flux through the hydrolytic pathway.

We also show the influence of pH on K_i values for each AT and ACT variants (Table III). In general, we observe that for each variant, K_i values diminish with increasing pH in accordance with the relationship which defines K_i as $k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$. However, because of the high SI values of AT-EK2, AT-EK3 and ACT-EK5, high K_i values are obtained (nM) with corresponding elevated k_{diss} .

Effect of pH on serpin/furin complex formation- A hallmark of the serpin-serine protease interaction is the formation of a complex that is not dissociated by heating and incubation in SDS. Quench-flow experiments revealed that these complexes were formed very rapidly (milliseconds, see figure 7). We determined whether the pH influenced the ability to form SDS-stable, irreversible serpin/furin complexes. Figures 3 (AT) and 4 (ACT) show that immunoblotting with anti-furin (MON-152) or anti-serpin (anti-His for AT or anti-ACT) enabled us to determine that the variants formed characteristic SDS-stable complexes (C) that migrated with an apparent

molecular mass of ~200 kDa. Cleaved inhibitor, I^c (43 kDa for AT, 41 kDa for ACT), uncleaved inhibitor (47 kDa for AT, 45 kDa for ACT), cleaved complex (C*) (72 kDa for AT-furin, 102 kDa for ACT-furin), and free enzyme (E) (83 kDa) are also shown. Of the six AT variants studied, we noticed that AT-EK2 and AT-EK3 did not readily associate with furin at pH 6.0, as shown by the weak band at 200 kDa. However, increasing the pH led to an enhanced rate of complex formation. Slight increases in basic pH-dependent complex formation were observed for other AT variants. Moreover, using the anti-His antibody, we showed that AT variants that do not possess the P₆ Arg in the furin recognition motif (AT-PDX, AT-EK1, and AT-EK4 but not AT-EK5) produced a cleaved complex form (C*) at pH 6.0. This would represent the entire serpin associated with a proteolytically processed form of furin. Lastly, all AT variants were cleaved (I^c) thereby flowing to the hydrolytic pathway k_3 . Wild-type AT did not interact with furin under various pH conditions (Fig. 3G).

When ACT variants were incubated with furin, we observed a different pattern (Fig. 4). The rate of irreversible inhibitory complex (C) formation for ACT-EK2 (Fig. 4A) in reactions with furin appeared greater at pH 6.0, as shown by the higher intensity of free enzyme (E) when compared to pHs ranging from 7.0 to 9.0. For ACT-EK3 (Fig. 4B), the formation of SDS-stable complexes at different pHs remained constant. Despite its very high SI value, ACT-EK5 (Fig. 4C) also formed an irreversible complex (C) with furin under different conditions, but a major species of 102 kDa corresponding to cleaved complex (C*) was detected at pH 7.0-9.0, but not at pH 6.0, using MON-152 antibodies. This could explain the high SI values obtained for ACT-EK5. All ACT variants, like AT variants, were cleaved, as shown by the presence of lower molecular weight forms (I^c). Wild-type ACT did not interact with furin under various pH conditions (Fig. 4D).

Inhibition of furin-dependent processing of ProvWF by AT and ACT variants- To examine the efficiency of each AT and ACT construct at inhibiting intracellular furin-dependent processing, hEK293 and hEK293-C4 (a cell line overexpressing furin) cells were co-transfected with a construct expressing pro-vWF, a known furin substrate (Van de Ven et al. 1991), together with constructs expressing various serpin variants. In the absence of inhibitors, only ~50% of vWF was secreted into the medium as the fully processed mature form (Fig. 5A). Overexpression of vWF by transfection of hEK293 cells does not allow endogenous furin to process all the 330 kDa precursor to the mature 220 kDa form of vWF (de Wit and van Mourik 2001), most likely because the proprotein processing system is saturated. The coexpression of vWF with each AT and ACT variant, but not the wild-type AT or ACT, inhibited pro-vWF proteolytic processing in hEK293 cells (Fig. 5A, upper panel). In general, AT variants seemed to be more efficient than ACT variants at abolishing processing as indicated by the patterns generated when 0.5 ug of DNA was transfected. Interestingly, AT-EK2 and AT-EK3 were detected both as cleaved and uncleaved forms whereas AT-PDX and AT-EK1 did not demonstrate this behaviour in a cellular context. None of the ACT variants generated a cleaved form (I^c) in our conditions, unlike the AT variants. To more fully assess this result, we examined the biochemical behavior of each AT and ACT variant in conditions where furin is overexpressed. The results clearly demonstrated that, while serpin/furin complexes were detected (C), all AT variants (Fig. 5B, upper panel) were cleaved (I^c) whereas ACT variants remained intact.

Effect of pH on furin hydrolysis of a peptide substrate- The effect of pH on furin catalysed hydrolysis of the substrate boc-RVRR-MCA is shown in Fig. 6. Upon increase of the pH from 6.0 to 9.0, K_M decreased linearly up to pH 7.5 and then remained constant. Over this pH interval, k_{cat} occurred as a bell-shaped form with a maximum is at pH 7.0. This led to an overall increase of k_{cat}/K_M over pH 6.0 to 8.0 indicating enhanced catalytic efficiency of furin over this pH range.

DISCUSSION

Furin is a ubiquitously expressed transmembrane serine protease that participates in some of the most basic processes of cellular function by cleaving precursor proteins into their active entities (Thomas 2002). These cleavages occur in various cellular organelles where pH conditions vary. A recent study focusing on the autoproteolytic activation of the furin zymogen demonstrated that following the first intramolecular cleavage (Leduc et al. 1992), transport to acidified TGN/endosomal compartments, furin cleaves the bound propeptide at a second internal P₁/P₆ Arg site (-Arg₇₀-Gly-Val₇₂-Thr-Lys-Arg₇₅-), resulting in propeptide dissociation and enzyme activation (Anderson et al. 2002). This suggests that non-canonical furin recognition motifs (where the P₄ Arg is missing) may be pH sensitive.

In this study, we introduced furin recognition sequences into the RSLs of AT and ACT in an attempt to design more potent and stable serpin-based inhibitors. The RSLs of serpins defines their ability to recognize and inhibit a particular protease. RSL modifications reassign the targets and change the serpin-protease interaction kinetics. We and others have previously shown that modifying the RSL of AT does not affect the nature of its essential biochemical properties such as the formation of SDS-stable irreversible complexes with furin (Dufour et al. 1998; Jean et al. 1998; Dufour et al. 2001; Anderson et al. 2002). In addition to further modifying the RSL of AT with other furin recognition motifs, we hypothesized that the various biochemical properties of ACT (Schechter et al. 1997) may yield more efficient inhibitors in certain cellular environments where pH tends to be acidic. The RSL (P₇-P₁ residues) of ACT was thus modified to introduce various furin recognition sequences (Watanabe et al. 1992), and the properties of the resulting variants were evaluated.

Initially, we expected that the true second association rate constant (k'_{ass}) of all serpin variants would significantly change as a function of pH. This is because the chymase-AT reaction

causes an increase in SI and a marked decrease in k_{ass} whereas decreases in SI are observed with ACT (Schechter et al. 1997). In our conditions of varying pH, we did not observe any striking differences in k'_{ass} for the AT and ACT furin mutants. We confirmed the rapid association with furin by quench-flow experiments, which are more an evaluation of the final reaction complex. Complex formation times < 7.2 ms at different pHs were reached by all AT variants (ex: AT-EK4, fig. 7A). However, slower complex formation rates were observed with the ACT-EK2/furin pair (~ 1000 ms) (Fig. 7B). It is probable that the reduced complex formation time of AT-furin pairs is caused by different RSL conformational structures. Indeed, the ACT loop is helical (Wei et al. 1994) whereas the AT loop is an extended β -strand (Elliott et al. 1996; Elliott et al. 1998). We can presume that the extended β -strand conformation of the AT loop is a better fit for the substrate-binding pocket of furin than the helical structure of the ACT loop at the time of association. Our results thus revealed that the canonical furin sequences (RXXR, RXRXXR, or RX(K/R)R) are pH-insensitive, i.e., that the substrate binding rate to the catalytic pocket of furin is independent of the different canonical motifs and is not a rate-limiting enzymatic step.

Serpins undergo the same first kinetic steps that normal substrates do in that proteolysis is not complete but rather stops at the acyl-enzyme intermediate stage (i.e., acylation step, k_2). Like all serine proteases, furin uses this enzymatic mechanism to cleave the peptide bond following a minimum of four kinetically significant steps: (1) substrate binding, (2) acylation, (3) deacylation, and (4) release of the N-terminal product. While the pre-steady-state behavior of furin has yet to be established with certainty, studies indicate that furin, like Kex2, a well-characterized yeast homolog of furin (Rockwell et al. 2002), exhibits burst kinetics in the cleavage of substrates with P₁ Arg. This suggests that the acylation step is not rate-limiting for cleavage by furin (Bravo et al. 1994; Krysan et al. 1999). With the k'_{ass} values of the various furin recognition motifs in the

serpin variants used in this study, we show with strong kinetic evidence that the initial association and acylation steps in the serpin mechanism are also not rate-limiting.

How can we thus explain the increased stability of irreversible inhibitory complexes at high pHs for certain variants? We previously demonstrated that the complex formation between AT-EK2 and furin was very rapid at neutral pH (Dufour et al. 2001), which has been confirmed by quench-flow experiments (Figure 7). These complexes are then dissociated after a few minutes, generating active furin and cleaved inhibitor. We showed that this is because the RSL P₆ Arg within the β -sheet structure of the serpin acts as a repulsion center with regard to the hydrophobic environment of the serpin's central body (Dufour et al. 2001). Since acylation rates remain constant as a function of pH, the increased stability observed for the AT-EK2-furin complex (i.e., pH 9.0; Figure 3C) can be explained by a reduced deacylation rate of the acyl-enzyme complex. This could also explain the decreased SI values for AT-EK2 and all AT variants at high pH. Since furin may possess similar kinetic properties to Kex2, i.e., the deacylation step is rate-limiting and pH-dependent, this would explain the exceptionally high substrate specificity seen with Kex2 and mammalian convertases. This is in marked contrast to the behaviour of the related subtilisin family of serine proteases, for which acylation is the rate-limiting step (Perona and Craik 1995) and which exhibit comparatively low substrate specificities (Gron et al. 1992).

Introduction of various Arginine residues within the P₁-P₆ region of AT probably affect the stability of the complex with furin due either to new or absent interactions with the body of the cleaved serpin. Based on the crystal structure of AT it is clear that the charged side-chain of Arg in the P₄ and P₆ position renders the complex less stable due to their contact with the hydrophobic regions of the serpin. Moreover, the added Arginines may also contribute to increasing the stability of the complex at high pH, which is in contrast to most serpin-enzyme

pairs (Calugaru et al. 2001; Plotnick et al. 2002), by creating local steric and charge impediments thereby influencing the accessibility of the hydroxyl ion to perform the deacylation step.

We examined the effect of the AT and ACT variants in wild-type hEK293 cells on furin-dependent processing of pro-vWF. This precursor is a substrate that is efficiently cleaved by furin (Wise et al. 1990). Expression of the AT and ACT variants in these cells abolished processing of pro-vWF, as demonstrated by the absence of the mature form (Fig. 5A). However, we noted that ACT variants seemed to be less efficient than AT variants at abolishing processing when similar serpin expression levels were compared (i.e., at 0.5 ug DNA). Interestingly, the biochemical behavior of the variants *in vitro* was reconstituted *in cellulo*, i.e., AT variants were readily cleaved by furin while ACT variants were not. Using cells that overexpressed furin (hEK293-C4 cells, Figure 5B), we again detected completely cleaved AT variants in the medium of hEK293-C4 cells while all the ACT variants were detected as intact, uncleaved forms. The higher stability of ACT in acidic environments (Schechter et al. 1997) compared to AT may contribute to maintaining the protein in an intact form.

Apart from processing precursors within the exocytic pathway, furin also participates in cleaving such precursors as *Pseudomonas* exotoxin A in endosomes (Chiron et al. 1994; Corboy and Draper 1997) and *Bacillus anthracis* protective antigen at the cell surface (Collier and Young 2003). It would thus be tempting to speculate that ACT variants may provide an interesting alternative to AT variants in the context of inhibiting furin-dependent processing of such precursors.

Acknowledgments- We are grateful to Dr. Klaus Klarskov for mass spectroscopy analysis of the cleaved serpins. We would especially like to thank Dr. Peter Gettins for helpful discussions and comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). R.L. holds an Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Senior Scholarship.

REFERENCES

- Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S., and Thomas, G. 2002. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* **277**: 12879-12890.
- Anglikar, H. 1995. Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* **38**: 4014-4018.
- Bergeron, F., Leduc, R., and Day, R. 2000. Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* **24**: 1-22.
- Bieth, J.G. 1995. Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. *Methods Enzymol* **248**: 59-84.
- Boudreault, A., Gauthier, D., and Lazure, C. 1998. Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem* **273**: 31574-31580.
- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., and Fuller, R.S. 1994. Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* **269**: 25830-25837.
- Calugaru, S.V., Swanson, R., and Olson, S.T. 2001. The pH dependence of serpin-proteinase complex dissociation reveals a mechanism of complex stabilization involving inactive and active conformational states of the proteinase which are perturbable by calcium. *J Biol Chem* **276**: 32446-32455.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R.A., and Lindberg, I. 2000. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* **275**: 36741-36749.
- Chiron, M.F., Fryling, C.M., and FitzGerald, D.J. 1994. Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J Biol Chem* **269**: 18167-18176.
- Collier, R.J., and Young, J.A. 2003. Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 45-70.
- Cooperman, B.S., Stavridi, E., Nickbarg, E., Rescorla, E., Schechter, N.M., and Rubin, H. 1993. Antichymotrypsin interaction with chymotrypsin. Partitioning of the complex. *J Biol Chem* **268**: 23616-23625.
- Corboy, M.J., and Draper, R.K. 1997. Elevation of vacuolar pH inhibits the cytotoxic activity of furin-cleaved exotoxin A. *Infect Immun* **65**: 2240-2242.
- de Wit, T.R., and van Mourik, J.A. 2001. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol* **14**: 241-255.
- Denault, J., Bissonnette, L., Longpre, J., Charest, G., Lavigne, P., and Leduc, R. 2002. Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Lett* **527**: 309-314.
- Denault, J.B. 2000. Etude de la région riche en cystéine de la convertase de mammifère humaine SPC1/furine. *Ph.D. Thesis*.
- Denault, J.B., Lazure, C., Day, R., and Leduc, R. 2000. Comparative characterization of two forms of recombinant human SPC1 secreted from Schneider 2 cells. *Protein Expr Purif* **19**: 113-124.
- Djie, M.Z., Le Bonniec, B.F., Hopkins, P.C., Hipler, K., and Stone, S.R. 1996. Role of the P2 residue in determining the specificity of serpins. *Biochemistry* **35**: 11461-11469.

- Dufour, E.K., Denault, J.B., Bissonnette, L., Hopkins, P.C., Lavigne, P., and Leduc, R. 2001. The contribution of arginine residues within the P6-P1 region of alpha 1-antitrypsin to its reaction with furin. *J Biol Chem* **276**: 38971-38979.
- Dufour, E.K., Denault, J.B., Hopkins, P.C., and Leduc, R. 1998. Serpin-like properties of alpha1-antitrypsin Portland towards furin convertase. *FEBS Lett* **426**: 41-46.
- Elliott, P.R., Abrahams, J.P., and Lomas, D.A. 1998. Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol* **275**: 419-425.
- Elliott, P.R., Lomas, D.A., Carrell, R.W., and Abrahams, J.P. 1996. Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol* **3**: 676-681.
- Gettins, P.G. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* **102**: 4751-4804.
- Gron, H., Meldal, M., and Breddam, K. 1992. Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry* **31**: 6011-6018.
- Han, J.H., Cote, H.C., and Tollefsen, D.M. 1997. Inhibition of meizothrombin and meizothrombin(desF1) by heparin cofactor II. *J Biol Chem* **272**: 28660-28665.
- Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., and Than, M.E. 2003. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* **10**: 520-526.
- Hopkins, P.C., and Stone, S.R. 1995. The contribution of the conserved hinge region residues of alpha1-antitrypsin to its reaction with elastase. *Biochemistry* **34**: 15872-15879.
- Huntington, J.A., Read, R.J., and Carrell, R.W. 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**: 923-926.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J., and Thomas, G. 1998. alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7293-7298.
- Johnson, D., and Travis, J. 1978. Structural evidence for methionine at the reactive site of human alpha-1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **253**: 7142-7144.
- Komiyama, T., and Fuller, R.S. 2000. Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry* **39**: 15156-15165.
- Komiyama, T., VanderLugt, B., Fugere, M., Day, R., Kaufman, R.J., and Fuller, R.S. 2003. Optimization of protease-inhibitor interactions by randomizing adventitious contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8205-8210.
- Krysan, D.J., Rockwell, N.C., and Fuller, R.S. 1999. Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem* **274**: 23229-23234.
- Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Bennett, H.P., and Hendy, G.N. 1998. In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human parathyroid hormone and parathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of a potent inhibitor. *J Biol Chem* **273**: 8572-8580.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A., and Thomas, G. 1992. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem* **267**: 14304-14308.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., and Thomas, G. 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* **267**: 16396-16402.
- Nash, P., McFadden, G., and Whitty, A. 2000. Application of linear free energy relationships to the serpin-proteinase inhibition mechanism. *FEBS Lett* **475**: 1-6.

- Perona, J.J., and Craik, C.S. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* 4: 337-360.
- Plotnick, M.I., Samakur, M., Wang, Z.M., Liu, X., Rubin, H., Schechter, N.M., and Selwood, T. 2002. Heterogeneity in serpin-protease complexes as demonstrated by differences in the mechanism of complex breakdown. *Biochemistry* 41: 334-342.
- Rockwell, N.C., Krysan, D.J., Komiyama, T., and Fuller, R.S. 2002. Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* 102: 4525-4548.
- Schechter, I., and Berger, A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162.
- Schechter, N.M., Plotnick, M., Selwood, T., Walter, M., and Rubin, H. 1997. Diverse effects of pH on the inhibition of human chymase by serpins. *J Biol Chem* 272: 24499-24507.
- Siezen, R.J., Creemers, J.W., and Van de Ven, W.J. 1994. Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *Eur J Biochem* 222: 255-266.
- Siezen, R.J., and Leunissen, J.A. 1997. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* 6: 501-523.
- Stavridi, E.S., O'Malley, K., Lukacs, C.M., Moore, W.T., Lambris, J.D., Christianson, D.W., Rubin, H., and Cooperman, B.S. 1996. Structural change in alpha-chymotrypsin induced by complexation with alpha 1-antichymotrypsin as seen by enhanced sensitivity to proteolysis. *Biochemistry* 35: 10608-10615.
- Steiner, D.F. 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 31-39.
- Thomas, G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 753-766.
- Van de Ven, W.J., Creemers, J.W., and Roebroek, A.J. 1991. Furin: the prototype mammalian subtilisin-like proprotein-processing enzyme. Endoproteolytic cleavage at paired basic residues of proproteins of the eukaryotic secretory pathway. *Enzyme* 45: 257-270.
- Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K., and Nakayama, K. 1992. Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 267: 8270-8274.
- Wei, A., Rubin, H., Cooperman, B.S., and Christianson, D.W. 1994. Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop. *Nat Struct Biol* 1: 251-258.
- Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J., and Kaufman, R.J. 1990. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9378-9382.

Table I
Influence of pH on stoichiometry of inhibition between the reactive site loop of α_1 -antitrypsin and α_1 -antichymotrypsin in reactions with furin

	Site (P ₇ -P ₁)	SI ^{a, c}			
		pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
AT-PDX	FLERIPR	3.5±0.5	3.4±0.03	2.9±<0.01	2.5±0.1
AT-EK1	FLERIRR	2.9±0.1	2.8±0.5	2.0±0.1	1.7±0.6
AT-EK2	FRERIPR	>200±18	>200 ^d	127±54	46±3
AT-EK3 ^b	FRERIRR	112±5.7	109±5.8	54±4.6	22±0.5
AT-EK4	FLERIKR	12±0.3	10±1.6	6.3±0.8	6.0±1.1
AT-EK5	LLERAKR	2.7±0.2	2.3±0.2	1.8±0.4	1.5±0.5
ACT-EK2	AVKRTRR	2.7±1.1	2.7±0.5	4.0±0.2	4.7±0.6
ACT-EK3	AVKRTRK	15±2.6	13±2.0	15±1.4	19±1.2
ACT-EK5	LLKRAKR	>200±0.6	>200 ^d	>200 ^d	>200 ^d

^a The SI values were determined by titration as described in “Materials and Methods.”

^b For this variant, complete inhibition was never achieved and the value given is an estimate of the SI determined at the time of maximum inhibition. This estimation of the SI value varied greatly from experiment to experiment.

^c Reported values are the mean of three independent experiments.

^d At these pHs, the substrate pathway is predominant for these variants and we did not calculate the error on the SI.

Table II
Kinetic association parameters determined for the reaction of α_1 -antitrypsin and α_1 -antichymotrypsin
reactive-site loop variants with furin^{a,d}

		$k_{ass} (M^{-1}s^{-1})$				$k'_{ass} (M^{-1}s^{-1})^b$			
Site (P ₇ -P ₁)		pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
AT-PDX	FLERIPR	2.7x10 ⁵ ±0.3	4.7x10 ⁵ ±1.1	8.8x10 ⁵ ±3.0	5.7x10 ⁵ ±1.4	9.6x10 ⁵ ±1.1	1.6x10 ⁶ ±0.4	2.5x10 ⁶ ±0.9	1.4x10 ⁶ ±0.4
AT-EK1	FLERIRR	3.6x10 ⁵ ±1.0	7.4x10 ⁵ ±1.2	8.6x10 ⁵ ±1.4	6.2x10 ⁵ ±1.9	9.7x10 ⁵ ±2.9	2.1x10 ⁶ ±0.3	1.7x10 ⁶ ±0.3	1.1x10 ⁶ ±0.3
AT-EK2	FRERIPR	n.d. ^c	n.d.	n.d.	2.3x10 ⁵ ±1.2	n.d.	n.d.	n.d.	1.1x10 ⁷ ±0.6
AT-EK3	FRERIRR	n.d.	n.d.	n.d.	2.8x10 ⁴ ±1.2	n.d.	n.d.	n.d.	6.2x10 ⁵ ±2.6
AT-EK4	FLERIKR	5.6x10 ⁴ ±1.8	1.8x10 ⁵ ±0.5	4.1x10 ⁵ ±0.9	3.3x10 ⁵ ±1.0	6.8x10 ⁵ ±2.2	1.8x10 ⁶ ±0.5	2.6x10 ⁶ ±0.6	2.0x10 ⁶ ±0.6
AT-EK5	LLERAKR	2.1x10 ⁵ ±0.4	4.0x10 ⁵ ±1.1	8.6x10 ⁵ ±2.6	8.2x10 ⁵ ±1.7	5.6x10 ⁵ ±1.0	9.2x10 ⁵ ±2.5	1.6x10 ⁶ ±0.5	1.2x10 ⁶ ±0.3
ACT-EK2	AVKRTRR	1.2x10 ⁵ ±0.5	7.9x10 ⁴ ±1.2	6.1x10 ⁴ ±1.9	9.7x10 ⁴ ±1.4	3.2x10 ⁵ ±1.4	2.1x10 ⁵ ±0.3	2.4x10 ⁵ ±0.8	4.5x10 ⁵ ±0.7
ACT-EK3	AVKRTRK	1.3x10 ⁴ ±0.4	1.6x10 ⁴ ±0.2	5.3x10 ³ ±2.2	2.9x10 ³ ±1.7	2.0x10 ⁵ ±0.6	2.0x10 ⁵ ±0.3	8.0x10 ⁴ ±3.3	5.5x10 ⁴ ±3.2
ACT-EK5	LLKRAKR	1.6x10 ³ ±0.02	5.8x10 ² ±2.1	n.d.	n.d.	>3.2x10 ⁵ ±0.4	>1.2x10 ⁵ ±0.4	n.d.	n.d.

^a Under the experimental conditions of the progress-curves assays, the cleavage pathway is negligible because $I_0 \geq SI \times E_0$ (Waley 1985). The inhibitor concentration was adjusted as a function of pH according to each serpin variant.

^b The product of the k_{ass} and SI values gives the k'_{ass} rate constant, which represents the formation of the covalent acyl-enzyme intermediate, EI'.

^c n.d., not determined

^d Reported values are the mean of twelve independent experiments.

Table III
K_i's values from titration curve for each serpin variant at different pHs^c

	K _i (nM or pM) ^b				Conc. ^a	
	pH	6	7	8		9
AT-PDX		48±0.7	27±1.5	13±0.04	4.0±0.1	pM
AT-EK1		26±0.8	19±0.8	4.0±0.1	1.3±0.1	pM
AT-EK2		5.0±1.3	14±2.0	1.5±0.9	0.1±0.02	nM
AT-EK3		2.4±0.1	1.9±0.4	0.38±0.02	0.03±0.02	nM
AT-EK4		162±1.5	57±2.7	20±1.1	5.0±0.3	pM
AT-EK5		12±0.6	8.0±0.7	5.0±0.6	2.0±0.3	pM
ACT-EK2		31±2.1	14±0.4	18±0.3	9.0±0.2	pM
ACT-EK3		309±8.0	166±3.2	142±0.5	85±0.3	pM
ACT-EK5		6.5±0.2	5.2±1.0	3.6±0.3	1.0±0.3	nM

^a Range of concentration order.

^b The calculated K_i values provide of the tight-binding titration equation relationship

^c Reported values are the mean of three independent experiments.

Figure legends

Scheme 1. Branched pathway for the suicide substrate inhibition mechanism of serpin action

This scheme shows the accepted minimal kinetic mechanism for the reaction of a serpin (I) with a proteinase (E) to form a stable, covalent inhibited complex (EI*). Initial formation of the noncovalent Michaelis complex (EI) is followed by acylation of the enzyme by the serpin to form the initial acyl-enzyme (EI') (first part of proteolytic process). The intermediate complex (EI') can partition (branch point in the mechanism) to undergo a conformational rearrangement, resulting, through the inhibitor pathway, in the formation of the final inhibited complex (EI*) EI* slowly decomposes through a single pathway, resulting in the release of cleaved serpin and active enzyme with rate constant k_5 . The proteinase component of the complex may also be cleaved at one or more sites by free proteinase (P) (either the same proteinase as E or a different one) to give E*I*, which cannot dissociate. This step has been well characterized for anti-chymotrypsin (Cooperman et al. 1993; Stavridi et al. 1996) and for heparin cofactor II (Han et al. 1997). According to the proposed kinetic scheme of Nash *et al.* (Nash et al. 2000), this inhibition mechanism incorporates the possibility that the steps with rate constants k_2 and k_4 might be reversible and that EI* can decompose either by direct hydrolysis (with rate constant k_5) or by reversion to EI'. The equilibrium dissociation constant of the Michaelis complex (K_s) represents the affinity between the inhibitor and the enzyme.

Fig. 1. Schematic reactive site loop sequences of recombinant wild-type AT and ACT and their variants

Single-letter amino acid sequences of the reactive site loop of wild-type and AT- and ACT-derived serpin variants. The amino acids at positions P₇-P₃' within the RSL are displayed

according to the nomenclature proposed by Schechter *et al.* (Schechter and Berger 1967). The residues substituted in the AT and ACT reactive site loop variants are *underlined*. The recognition site for elastase (Johnson and Travis 1978) and chymotrypsin (Cooperman *et al.* 1993) and the cleavage site for furin (Jean *et al.* 1998) are marked by *asterisks* between the P₁-P_{1'} scissile bond.

Fig. 2. Purification of recombinant wild-type AT and ACT and their variants

Analysis of the purified His-tagged wild-type and variant serpins expressed in prokaryotic cells. Recombinant proteins were purified from isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside-induced bacterial cell extracts using Ni²⁺-nitrilotriacetic acid affinity resin and MonoQ column chromatography. The proteins were subjected to 10% SDS-PAGE and stained with GelCode Blue. A, purification of recombinant wild-type AT and AT variants (1 μ g of protein). B, purification of recombinant wild-type ACT and ACT variants (1 μ g of protein).

Fig. 3. Immunoblot analysis of complex formation stability at different pHs between AT reactive site loop variants and furin

90 nM of AT-PDX (A) and AT-EK1 (B), 1.5 μ M of AT-EK2 (C), 1 μ M of AT-EK3 (D), 200 nM of AT-EK4 (E), 70 nM of AT-EK5 (F) and 1 μ M of wt-AT (G) were incubated with 30 nM of furin at 37°C for 20 min in 180 μ L of modified kinetic buffer containing 20 μ g/ml BSA. The reactions were stopped by the addition of 5 mM EDTA. The samples were lyophilized then boiled in Laemmli buffer. Upper panel, the non-complexed and complexed furin were revealed by MON-152. Bottom panel, the non-complexed and complexed AT variants were detected by anti-His-tag. C, enzyme-serpin complex; C*, cleaved complex; E, enzyme; I, uncleaved serpin; I*, cleaved serpin. The result is representative of three independent experiments.

Fig. 4. Immunoblot analysis of complex formation stability at different pHs between ACT reactive site loop variants and furin

90 nM of ACT-EK2 (*A*), 500 nM of ACT-EK3 (*B*), 700 nM of ACT-EK5 (*C*) and 1 μ M of wt-ACT (*D*) were incubated with 30 nM of furin at 37°C for 20 min. in 180 μ L of modified kinetic buffer containing 20 μ g/ml BSA. The reactions were stopped by the addition of 5 mM EDTA. The samples were lyophilized then boiled in Laemmli buffer. Upper panel, the non-complexed and complexed furin were revealed by MON-152. Bottom panel, the non-complexed and complexed ACT variants were detected using an anti-antichymotrypsin polyclonal antibody. *C*, enzyme-serpin complex; *C**, cleaved complex; *E*, enzyme; *I*, uncleaved serpin; *I^c*, cleaved serpin. The result is representative of three independent experiments.

Fig. 5. Inhibition of maturation of provWF by different AT and ACT reactive site loop variants *in cellulo*

A, Upper panel, the ability of each AT and ACT variant to inhibit processing of provWF in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected either with 4 μ g of provWF vector or cotransfected with 0.5 μ g or 4 μ g of constructs expressing the different AT and ACT reactive site loop variants, as indicated above the panel. At 24 h post-transfection, the cells were metabolically labelled with [³⁵S]Met/Cys for 4 h, after which medium was harvested. VWF proteins were immunoprecipitated with anti-vWF. Inhibition of provWF maturation was analyzed on 8% SDS-PAGE. *Lane mock*, pcDNA3 control. *ProvWF*, immature form of vWF; *vWF*, mature form. Bottom panel, differential rates of generation of cleaved serpin. The serpins remaining in the medium were immunoprecipitated with anti-AT or anti-ACT. The proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE. *I*, uncleaved serpin; *I^c*, cleaved serpin. *B*, Upper panel, differential rates of

generation of cleaved serpin in stable hEK293-C4 cells. The serpins remaining in the medium were immunoprecipitated with anti-AT or anti-ACT antibodies. The proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE. Lane mock, pcDNA3 control. *C*, enzyme-serpin complex; *I*, uncleaved serpin; *I'*, cleaved serpin. Bottom panel, the complex formation between various reactive site loop serpins in the medium. Furin was immunoprecipitated with anti-M2. Proteins were analyzed by 8% SDS-PAGE. *C*, enzyme-serpin complex; *E*, enzyme. The result is representative of two independent experiments.

Figure 6. Effect of pH on furin catalysis of the peptide substrate boc-RVRR-MCA.

Parameters K_M , k_{cat} , and k_{cat}/K_M are reported in A, B, and C, respectively. Kinetic assays were performed in 100 mM Hepes, pH 6-9, 1 mM $CaCl_2$, 1mM β -mercaptoethanol, and 500 μ g/ml BSA. Values were determined by initial-rate method and were obtained by nonlinear regression analysis to fit the data to the Michaelis-Menten rate equation.

Fig. 7. Quenched-flow/immunoblot analysis of rate of complex formation of AT-EK4 and ACT-EK2 reactions with furin.

Initial concentrations of 210 nM for the variant serpins (*A*, *B*) and 30 nM for furin ($[I]_0/[E]_0$ ratio of 7:1) were mixed for various quench times and the reactions were stopped with 5 mM EDTA. Final concentrations were 70 nM (serpins) and 10 nM (furin). Non-complexed and complexed furin immunoreactivity was revealed by MON-152 monoclonal antibody. *C*, enzyme-serpin complex; *E*, enzyme. The result is representative of two independent experiments.

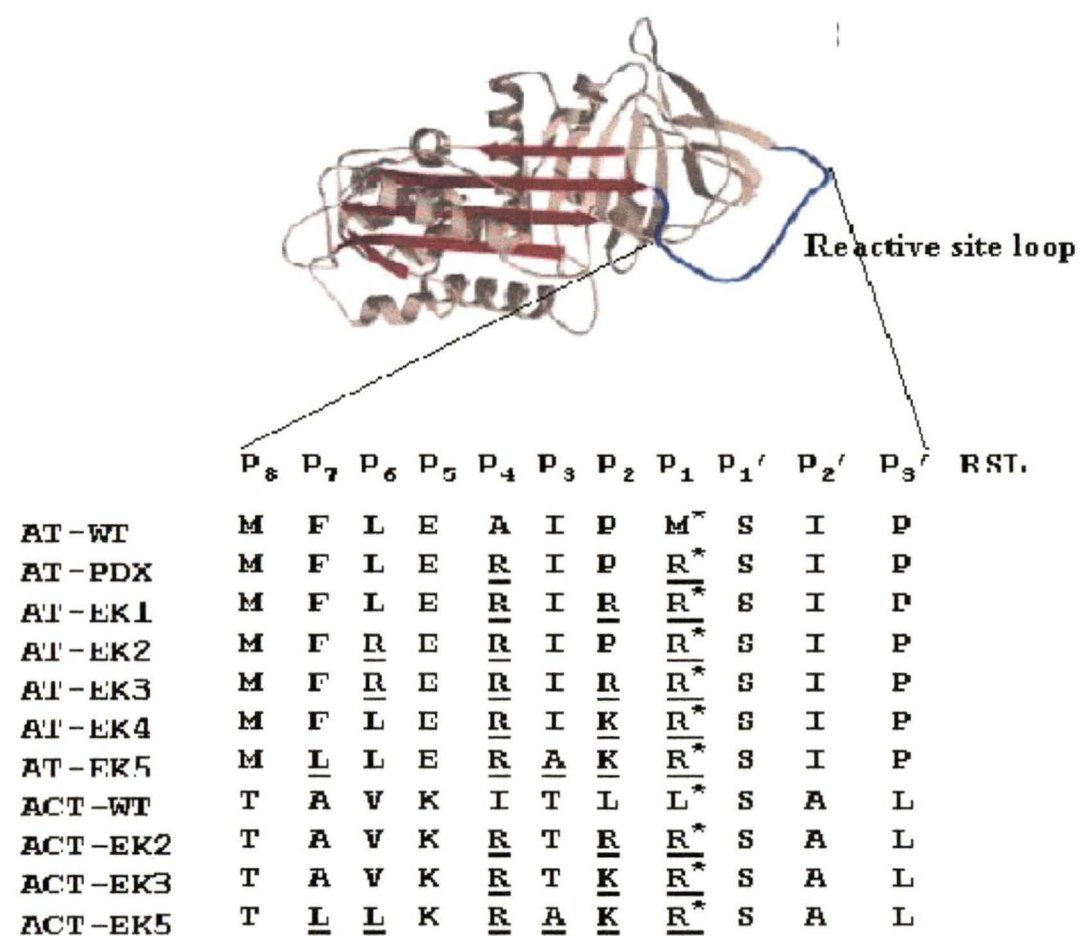


Figure 1

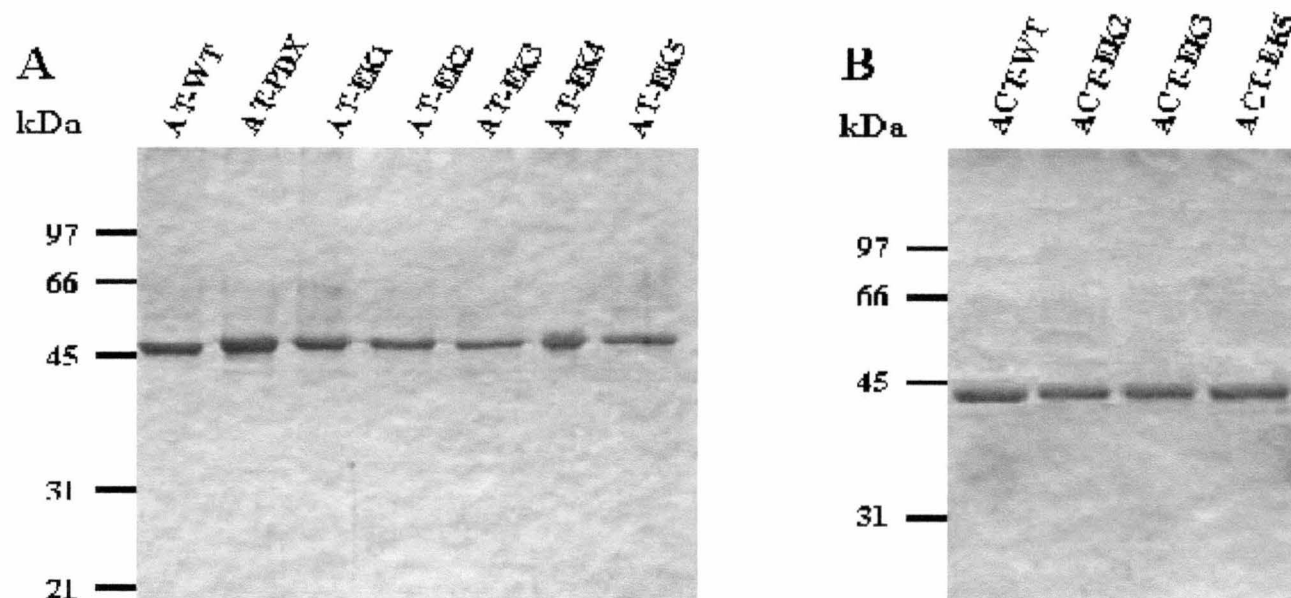


Figure 2

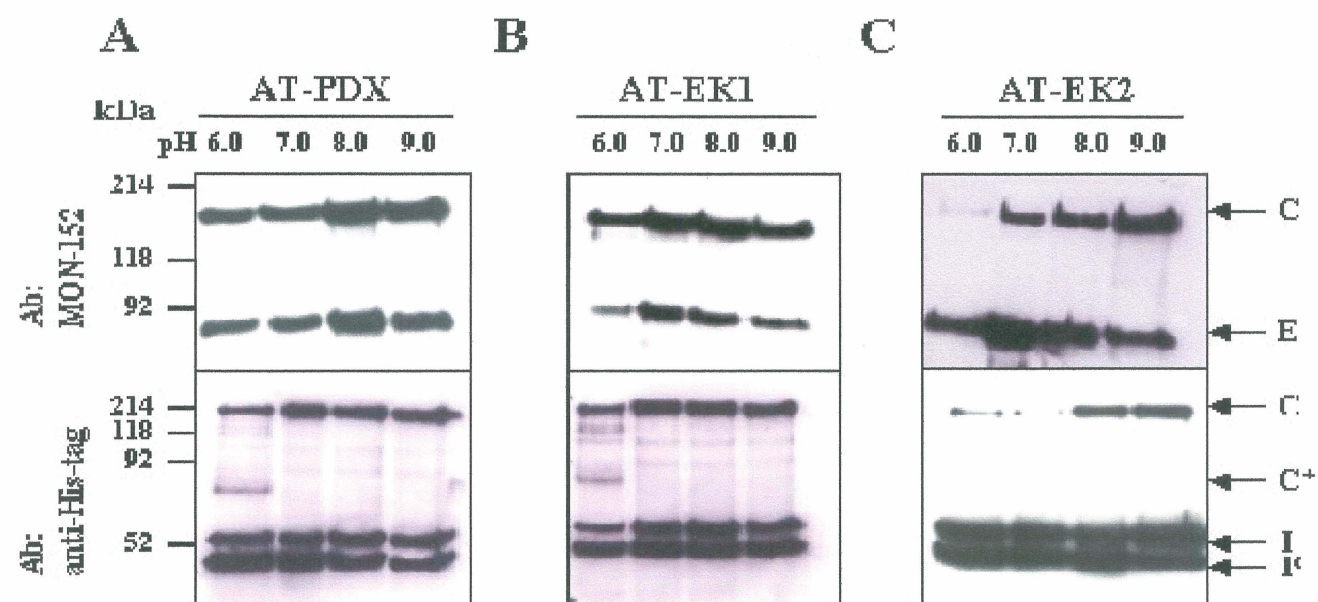


Figure 3

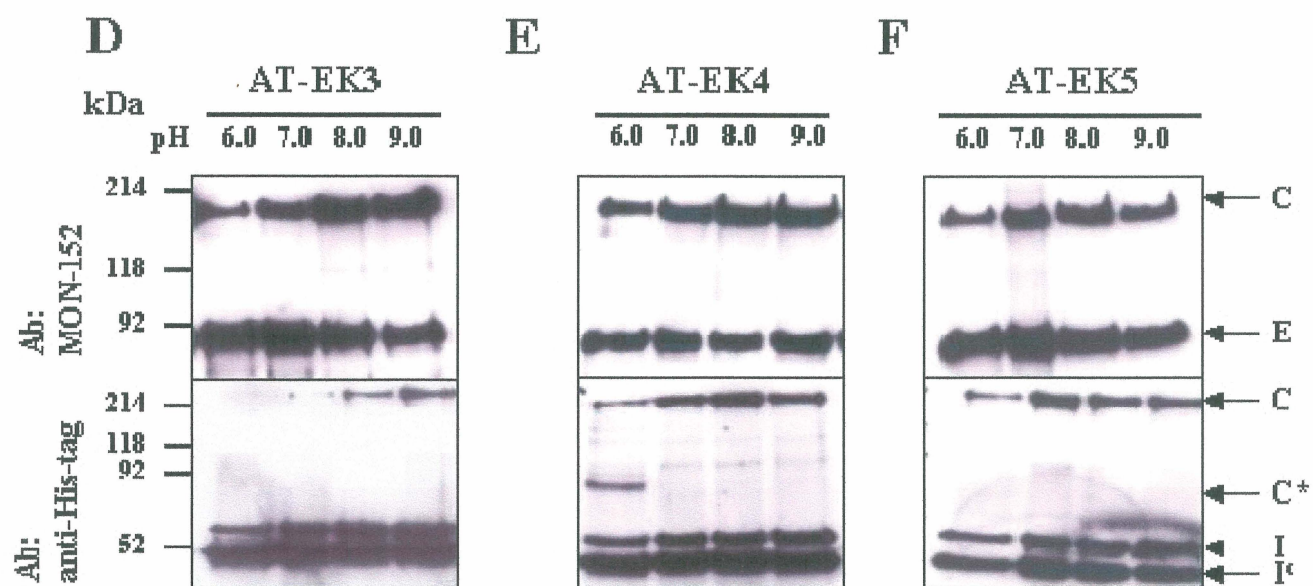
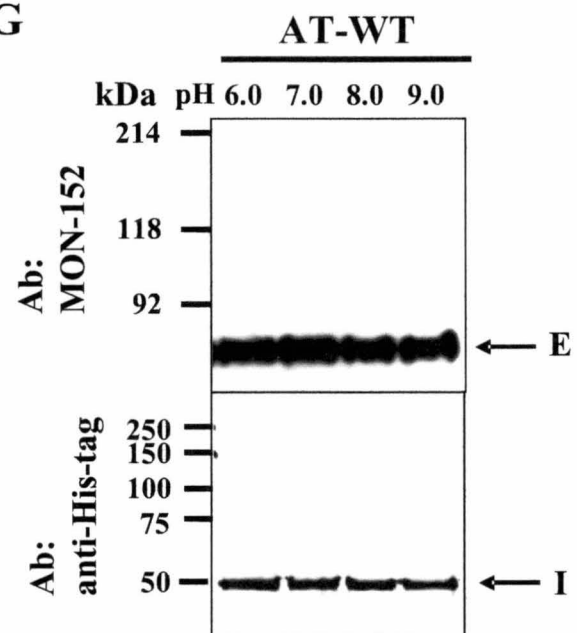


Figure 3

G

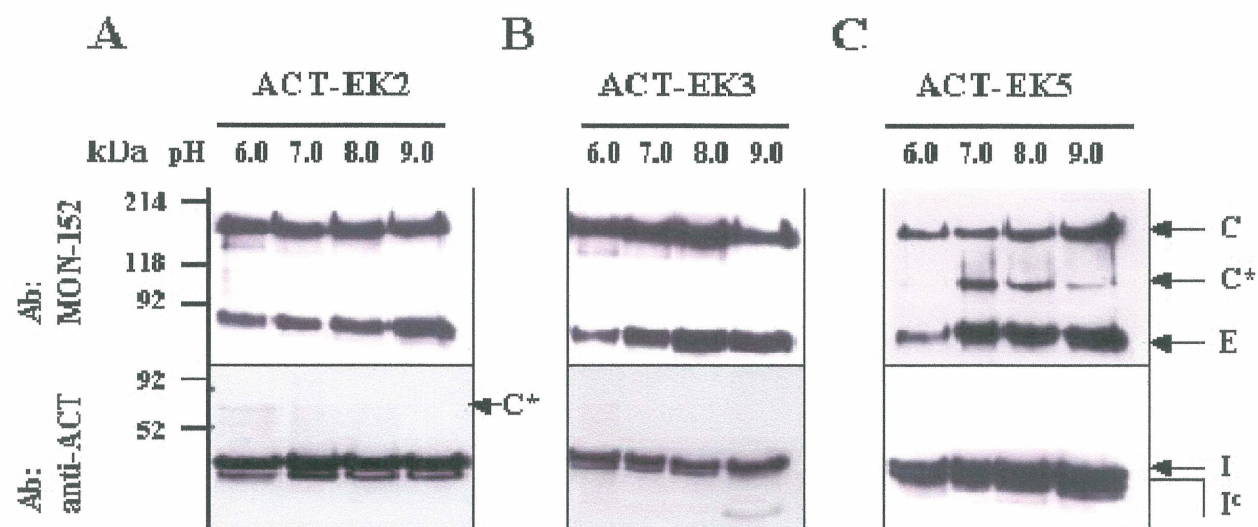


Figure 4

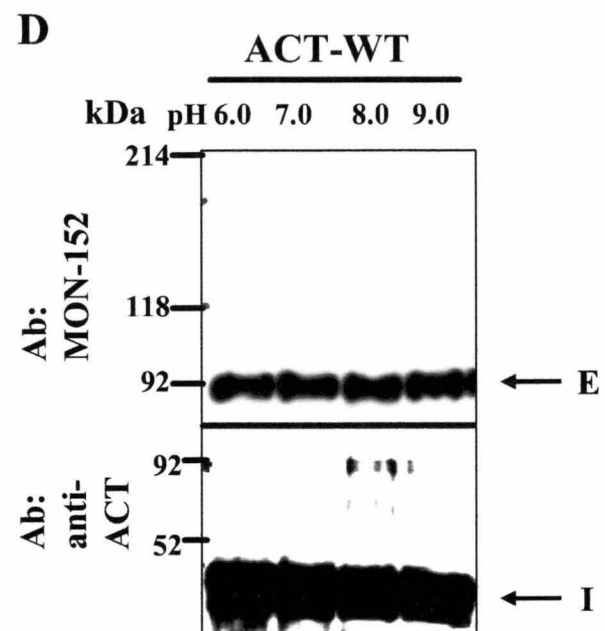


Figure 4

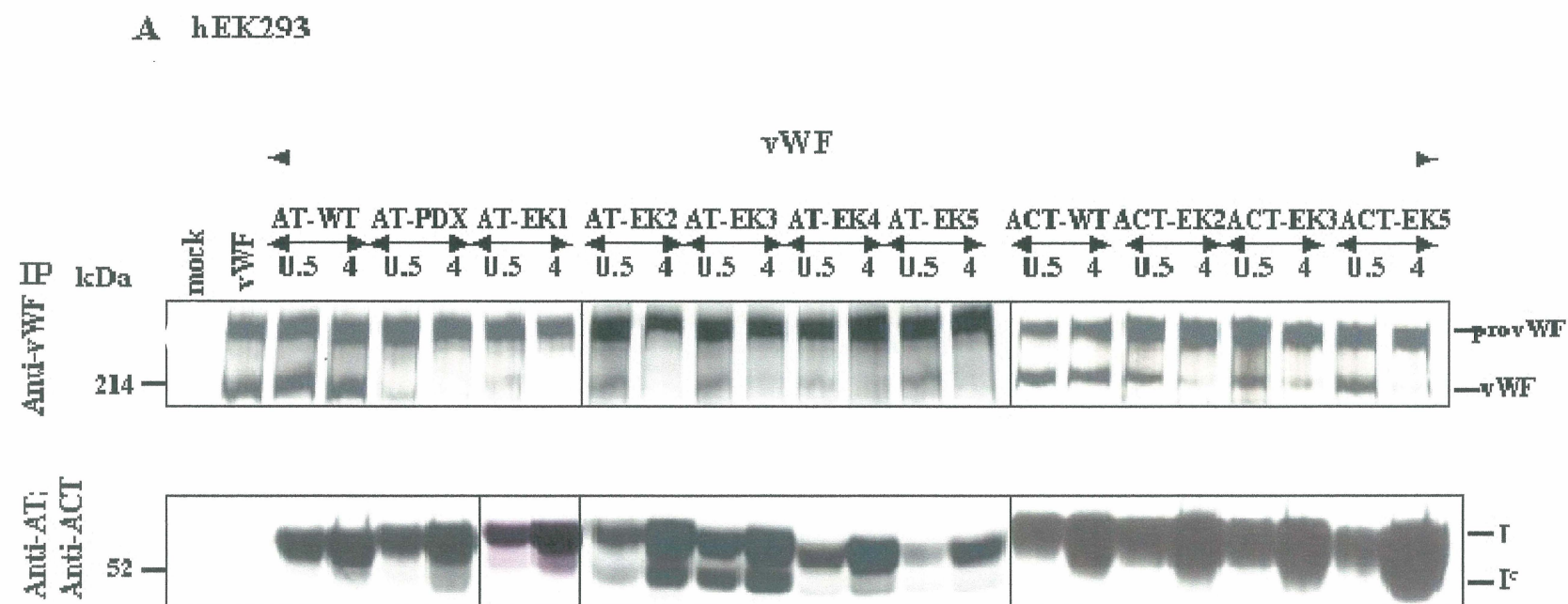


Figure 5

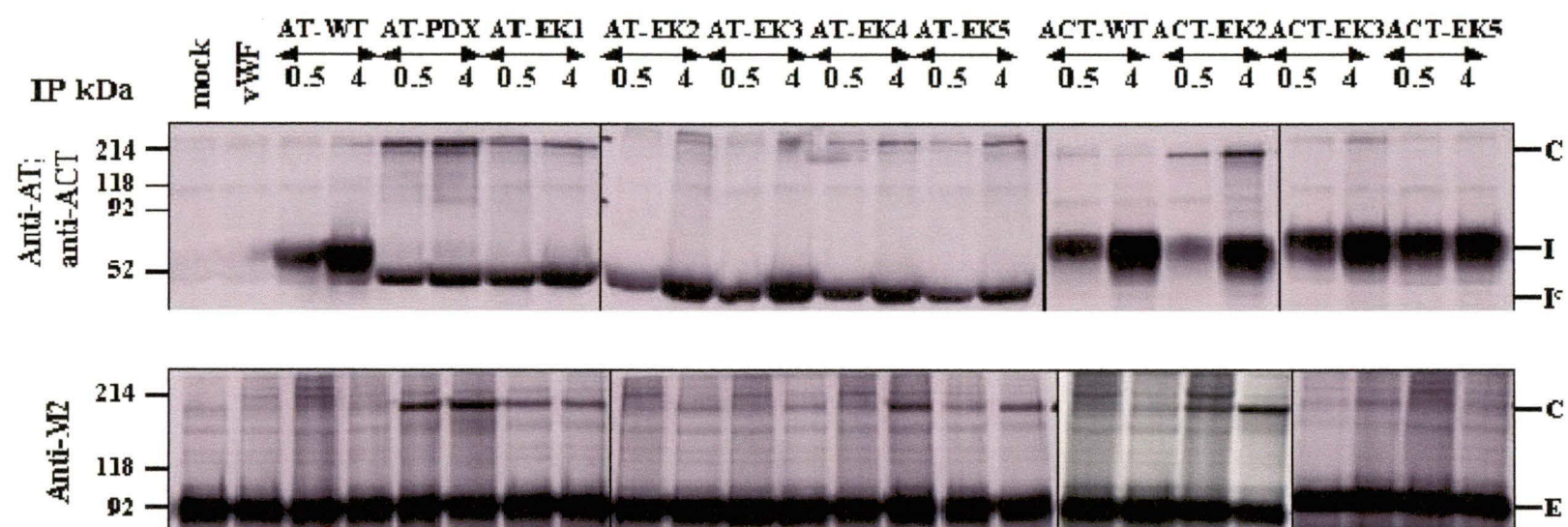
B hEK293-C4

Figure 5

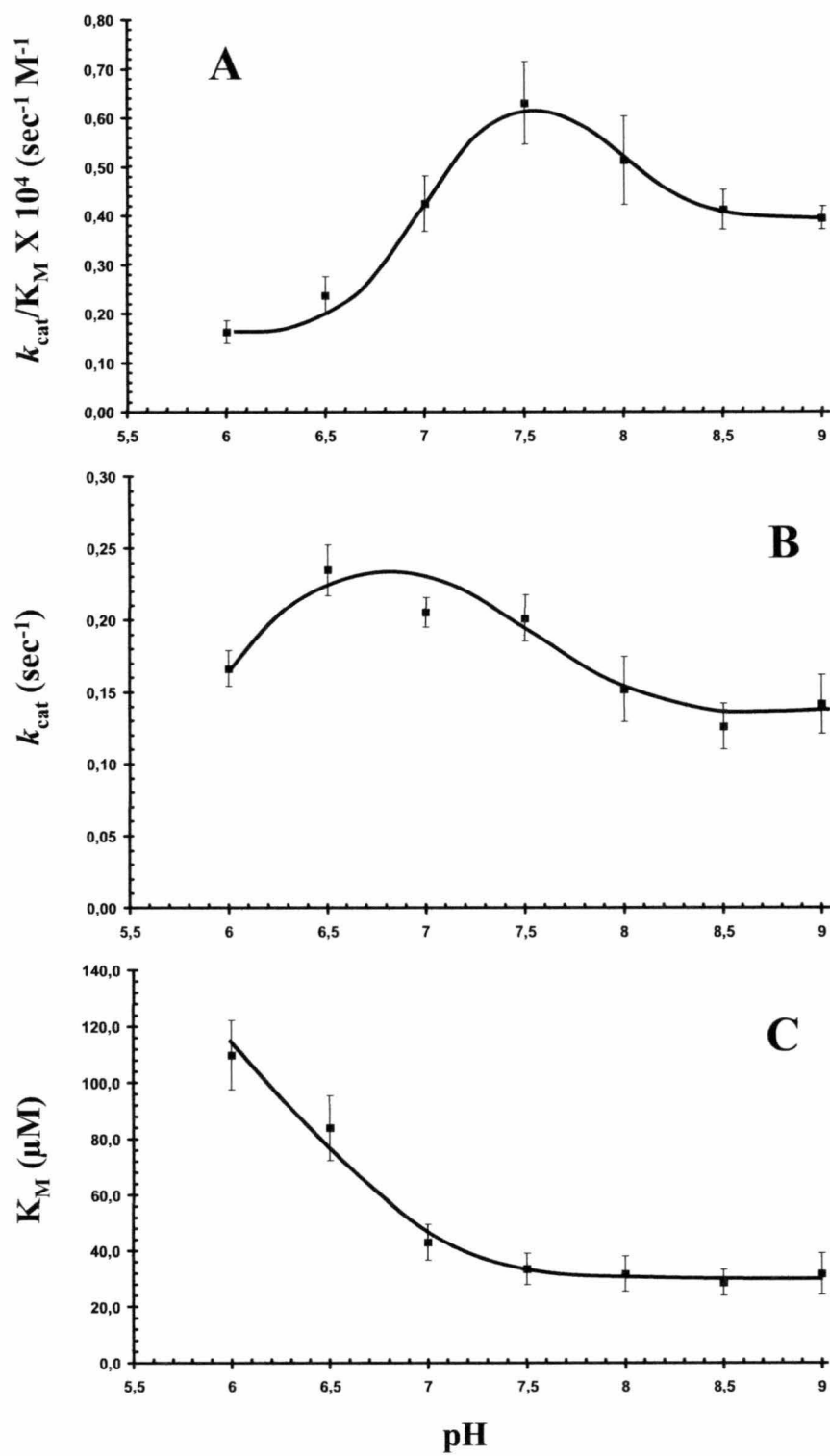


Figure 6

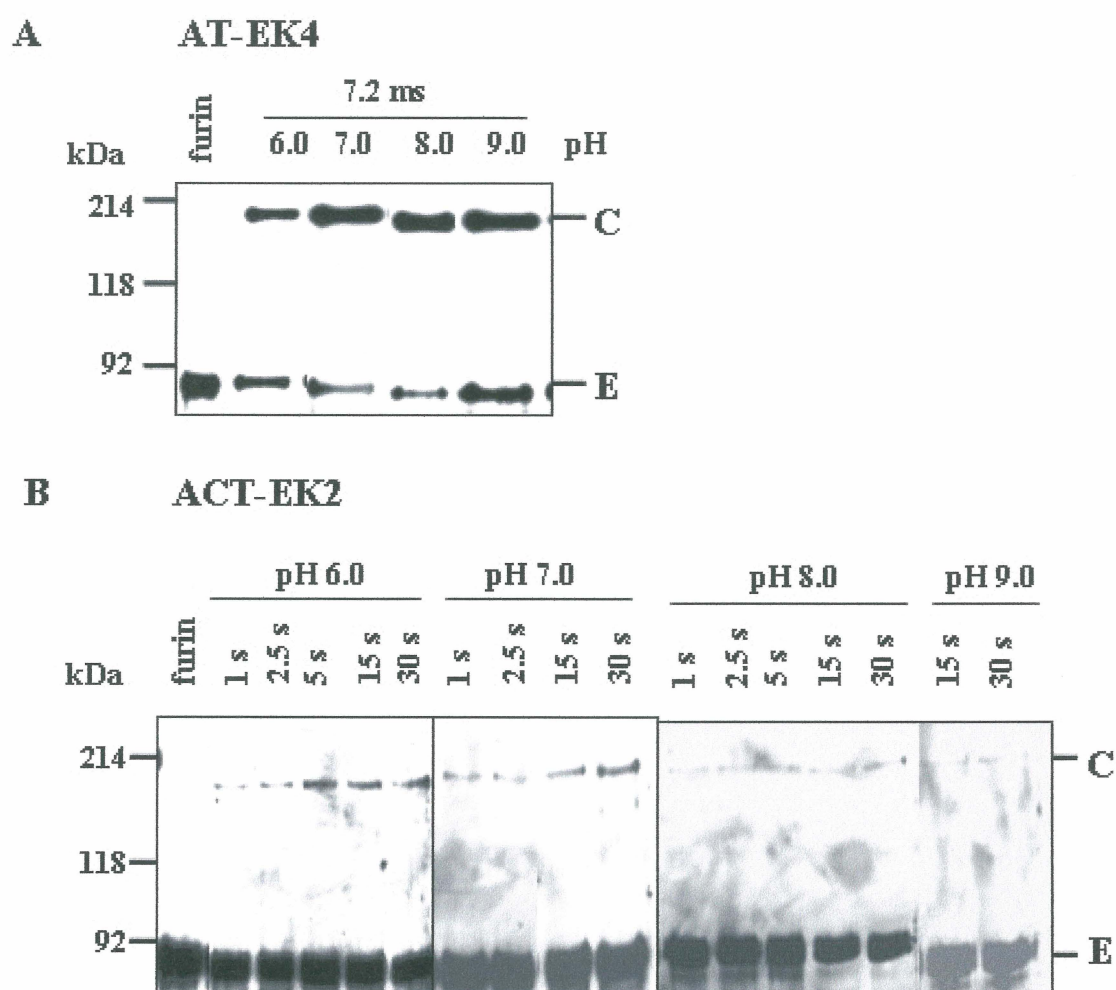
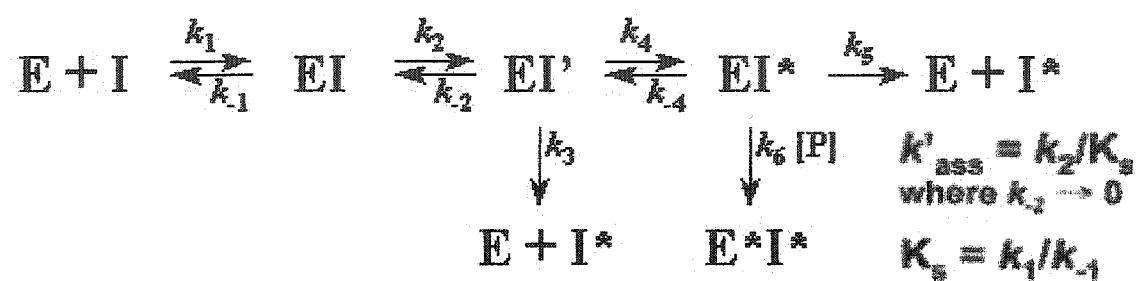


Figure 7



Scheme 1

4^{ème} article

**Leukocyte Elastase Inhibition Therapy in Cystic Fibrosis:
Role of Glycosylation on the Distribution of
Alpha-1-Proteinase Inhibitor in Blood versus Lung**

**ANDRÉ M. CANTIN, DONALD E. WOODS,
DIANE CLOUTIER, JULIE HÉROUX, ERICK K. DUFOUR,
and RICHARD LEDUC**

**JOURNAL OF AEROSOL MEDICINE
Vol.15, No2, 2002, pp.141-148**

Contribution: Dans cet article, j'ai transféré mes connaissances sur les serpins aux techniciens du laboratoire du Dr.Cantin. J'ai établi l'expression et la purification de l'AT-WT. J'ai participé à la révision et correction du papier.

5^{ème} article

Polyethylene Glycol Conjugaison at Cys²³² Prolongs the Half-Life of α 1 Proteinase Inhibitor

**André M. Cantin, Donald E. Woods, Diane Cloutier,
Erick K. Dufour, and Richard Leduc**

**American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology
Vol.27, pp.659-665, 2002**

Contribution: Dans cet article, j'ai transféré mes connaissances sur les serpins aux techniciens du laboratoire du Dr. Cantin. J'ai établi l'expression et la purification de l'AT-WT. J'ai participé à la révision et correction du papier.

Discussion

Il a été établi que les serpins opèrent comme des inhibiteurs du mécanisme du substrat suicide, i.e. qu'elles agissent comme étant des pseudo-substrats envers sa protéase cible. Dans ce mécanisme (Schéma 1), après la formation d'un complexe Michaelis initial (EI), qui est suivi par la formation d'un complexe intermédiaire (EI'), après lequel la réaction se sépare entre deux voies alternatives et compétitives; une qui amène vers un complexe stable inhibiteur-enzyme (EI*) et l'autre à la relâche d'un inhibiteur inactif et clivé (I*) et une enzyme active libre (E). Une fois que le complexe EI* formé, il peut se défaire lentement par une combinaison des voies k_4 et k_3 ou par une alternative, k_5 . La nature du mécanisme d'inhibition de base implique que l'inhibiteur est épuisé par la voie catalytique. Les essais qui sont fait dans ce travail ont été accomplis sous des conditions où un tel épuisement a été négligeable.

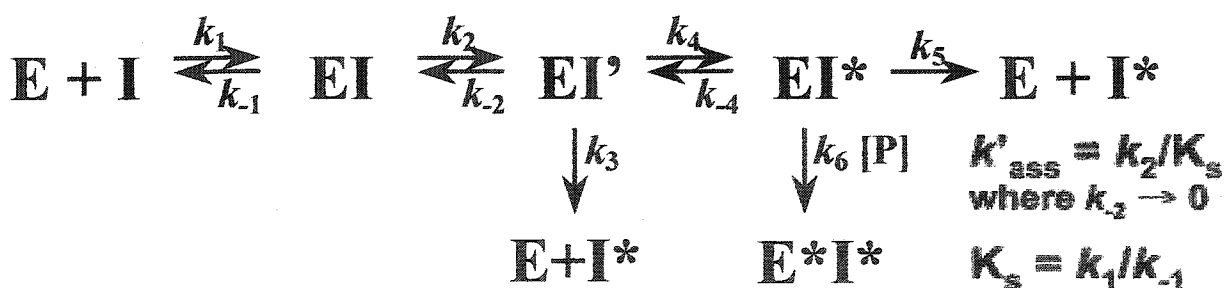


Schéma 1

Plus spécialement, la formation du complexe entre une serpine et une sérine protéinase exige quatre processus distincts : 1) la reconnaissance et l'interaction entre la position P₁ de la serpine et le site de liaison S₁ de l'enzyme tout le long des interactions des sous-sites (dans notre cas P₄ Arg de AT-PDX); 2) le clivage du lien P₁-P'₁ et la

formation d'un lien acyl-enzyme covalent ou un intermédiaire tétraédrique; 3) repliement de la serpine par insertion du brin s4A à l'intérieur du feuillet β A; et 4) la très lente déacylation pour libérer l'enzyme.

L' α_1 -antitrypsine et ses variants ont été énormément utilisés comme modèle des serpins pour élucider le mécanisme d'inhibition par lequel les serpins inhibent les sérines protéases (Hopkins et al., 1993; Hopkins et Stone, 1995; Lawrence, 1997; Wilczynska et al., 1997; Elliot et al., 1996; Whisstock et al., 1996), d'après le mécanisme d'inhibition du substrat suicide. Cependant, la majorité des enzymes avec qui ces variants interagissent appartenaient à la famille chymotrypsine des sérines protéases. La furine humaine appartient à la famille S8 des peptidases, aussi connu comme la famille subtilisine, et a une architecture très différente de celle de l'élastase, la cible physiologique de l'AT natif. Présentement, à la différence des enzymes de la famille chymotrypsine, il existe des inhibiteur non naturels pour cette classe de protéinase. La première étude d'inhibition de la furine a été accomplie en utilisant un chlorométhyl cétone peptidique (décanoyl-Arg-Glu-Lys-Arg-chlorométhyl cétone) pour abolir la production de la gp120, la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH (Hallenberger et al., 1992). Cette stratégie basée sur un peptide a été employée pour inhiber la furine ou la maturation par l'entremise des convertases des autres précurseurs (Denault et al., 1995; Angliker, 1995; Jean et al., 1995; Vey et al., 1995; Vindrola et Lindberg, 1993). Il a été démontré qu'un peptide polyarginine (nona-L-arginine) est un puissant inhibiteur de la furine, avec un K_i de 40 nM (Cameron et al., 2000). Le prodomaine de la furine agit comme un autoinhibiteur qui régule son activation enzymatique lors sa biosynthèse (Bissonnette et al., 2004; Anderson et al., 2002). Inversement, il a été aussi observé que

les inhibiteurs basés sur des protéines, par exemple un variant du troisième domaine du ovomucoïde de l'inhibiteur Kazal, pourrait affecter l'activité furine (Lu et al., 1993). De plus, des variants de l'égline C, un membre de la famille 1 d'inhibiteur chymotrypsine de la pomme de terre des inhibiteurs canoniques de sérines protéases, contenant divers motifs de reconnaissance de la furine ont été développés pour inhiber la furine (Komiyama et Fuller, 2000). Avec des mutations aléatoires à des positions clés de la structure de l'égline C, à l'extérieur de la boucle, ceci a permis de créer des inhibiteurs plus puissants envers la furine en optimisant les contacts à l'extérieur du site de liaison du substrat (Komiyama et al., 2003). En se concentrant sur les inhibiteurs de sérine protéase connus et avec la connaissance de la spécificité enzymatique de la furine, l'ingénierie du variant de l' α_1 -antitrypsine AT-PDX a été produite. Cette protéine, dans lequel le site réactif AIPM de l'AT a été remplacé par le site de reconnaissance de la furine RIPR, a montré des propriétés inhibitrices puissantes envers la furine (Anderson et al., 1993). Cependant, le mécanisme par lequel la protéine a aboli l'activité de la convertase était resté inconnu.

Basé sur ces résultats, nous avons initialement énoncé l'hypothèse que l'AT-PDX joue comme un inhibiteur compétitif envers la furine et que les propriétés de la serpine originale AT ont été compromises. Il fut démontré que les modifications des résidus du côté N-terminal du lien P_1 - P'_1 (Schechter et Berger, 1967) ont été montrées pour diminuer ou abolir l'habilité de la serpine à inhiber irréversiblement sa protéase cible (Hopkins et Stone, 1995). De plus, les résultats récents ont montré que la région P_6 - P_2 du site réactif de l'AT est important pour l'inhibition rapide et la formation des complexes stables serpine-protéinase (Chaillan-Huntington et al., 1997). L'interaction entre AT-

PDX et la furine a résulté à la formation d'un complexe irréversible résistant à la chaleur et à la dénaturation. Donc, le remplacement des résidus P₁ et P₄ dans AT-PDX n'a pas altéré les capacités inhibitrices de type serpine afin de former un complexe de haut poids moléculaire *in vitro* et *in vivo*. Ceci est la première fois qu'un variant de l'AT montre des propriétés de type serpine envers une sérine protéase de la famille des subtilisines de mammifère. Auparavant, il n'y avait pas d'études qui expliquaient le mécanisme d'inhibition par lequel le variant AT-PDX inhibait la furine (Anderson et al., 1993).

Des études récentes ont décrit de quelle façon AT-PDX a été utilisé pour contrôler la production de peptides biologiquement actifs en inhibant l'activité protéolytique de la furine dans divers systèmes d'expression. L'expression hétérologue de la serpine a supprimé la croissance hypertrophique induite par les cardiocytes étirés aussi bien que la maturation des peptides natriurétiques cervicaux (Sawada et al., 1997), a contrôlé la croissance des cellules β pancréatiques (Kayo et al., 1997) et a inhibé la maturation des précurseurs des glycoprotéines viraux (Zarkik et al., 1997).

Quoique les nombreux substrats précurseurs contenant des séquences de reconnaissance de la furine continuent d'être identifiés, les substances inhibitrices ou les mécanismes par lesquels les composés inhibiteurs modulant l'activité de cette enzyme restent moins explorées. Les données précédentes obtenues à partir des expériences élaborées pour évaluer la spécificité de substrat de la furine ont démontré que la séquence minimale de reconnaissance de la furine (où les résidus arginines sont présents aux positions P₁ et P₄ de la molécule précurseur) est un élément crucial afin que la furine s'associe et clive son substrat. En effet, la majorité des proprotéines maturées par la furine contient un site de reconnaissance consensus -Arg-Xaa-(Lys/Arg)-Arg|- (Molloy

et al., 1992). Cependant, certains précurseurs clivés efficacement par la furine, tel que la proalbumine (Misumi et al., 1991), proprotéine C (Drews et al., 1995) et l'hormone parathyroïde (Hendy et al., 1995), ne possède pas d'arginine en P₄ et, cependant, la furine peut se rallier sur d'autres déterminants pour identifier son site de clivage. Dans le cas de la proalbumine et la proprotéine C, les résidus Arg aux positions P₂ et P₆ pourraient possiblement contribuer à la reconnaissance du processus, alors que l'hormone parathyroïde possède des Lys en P₂, P₃ et P₆, qui compenseraient pour le manque d'arginine. Les modèles de la région de liaison du substrat de la furine (Siezen et al., 1994) et autres études basés sur le design de substrats peptidiques et sur l'ingénierie de protéines pour caractériser la spécificité séquentielle de cette enzyme (Lazure et al., 1998; Jean et al., 1995; Krysan et al., 1999) indiquent que le nombre et la localisation des résidus basiques trouvés à l'intérieur des substrats sont des facteurs importants dans la reconnaissance par les sous-sites de la furine.

Basé sur le site minimal de reconnaissance nécessaire pour un clivage efficace par la furine, Arg-Xaa-Xaa-Arg, un variant AT (AT-Portland ou AT-PDX) qui contient ce motif de reconnaissance, a été décrit (Anderson et al., 1993). Ce variant a été montré d'être un inhibiteur puissant et hautement sélective pour l'activité amidolytique de cette convertase. Les études *in vitro* (Jean et al., 1998) et *in vivo* ont démontré sa capacité d'inhiber la maturation dépendante de la furine de nombreux précurseurs protéiques. Cette inhibition efficace est causée par le comportement typique du caractère serpine du variant, i.e. sa liaison pratiquement irréversible et slow-tight binding à la furine (Dufour et al., 1998, Jean et al., 1998).

Dans cette étude, nous avons analysé les propriétés biochimiques des variants AT contenant divers motifs de reconnaissance de la furine à l'intérieur de la région P_6 - P_1 de la serpine. Il est fermement établi que la nature du résidu P_1 à l'intérieur du RSL des serpins joue un rôle crucial dans la détermination de la spécificité de la serpine pour sa protéase cible (Owen et al., 1991; Sherman et al., 1992). Quoique le résidu P_1 est crucial dans la liaison primaire avec le site actif de la protéase, d'autres résidus au-delà du lien peptidique P_1 - P_1' du RSL apparaissent aussi être important dans la régulation de l'interaction et la spécificité inhibitrice entre la serpine et la protéinase, par contre, l'un ou l'autre promouvrait ou restreignerait l'inhibition rapide et la formation des complexes serpine-protéinase (Djic et al., 1996; Chaillan-Huntington et al., 1997). En substituant des résidus par des arginines ou des lysines à des positions clés à l'intérieur du RSL qui contenait le signal minimal de reconnaissance d'AT-PDX (LERIPR) à AT-EK1 (LERIRR), AT-EK2 (RERIPR), ou AT-EK4 (LERIKR) n'a pas influencé la constante de vitesse d'association (k_{ass}) de ces variants avant la bifurcation de l'embranchement de la voie du substrat suicide (Schéma 1). Cependant, AT-EK3 (RERIRR) a montré une diminution de 5 fois du k_{ass} . Il est probable que l'orientation spatiale de la chaîne latérale de l'arginine en P_2 et P_6 n'est pas correctement dirigée vers l'interface de la pochette de liaison de la furine. Ou bien, l'influence stérique des autres arginines adjacentes peut altérer la structure de la boucle. Ceci pourrait expliquer la diminution du k_{ass} d'AT-EK3. Le k_{ass} , dérivé à partir de l'analyse de courbe de progression d'inhibition, est une mesure de la vitesse générale de la transformation du complexe non covalent de Michaelis (EI) dans le complexe final inhibé, EI*.

Basé sur un modèle de la structure d'AT-PDX (Jean et al., 1998), il a été proposé que la double substitution en Arg aux positions P₁ et P₄ devrait avoir des effets négligeables sur la conformation générale de la serpine parce que les deux chaînes latérales font face au solvant et donc ne participent pas aux interactions tertiaires. Inversement, il est possible que l'incorporation de résidus Arg en P₂ et/ou P₆ et un résidu Lys à P₂ pourraient altérer la conformation β allongée du RSL (Hendy et al., 1995), ainsi en affectant l'interaction avec la protéase et une réduction concomitante du k'_{ass} (multipliant k_{ass} par SI donne $k'_{\text{ass}} = k_2/K_s$, qui correspond à la vraie constante de vitesse de second ordre de la formation de EI', i.e. les étapes précédentes au point d'embranchement; Ref. Gettins et al., 1996 et Schéma 1). Curieusement, nous observons que le k'_{ass} reste plutôt constant (sauf AT-EK4), suggérant que ces résidus basiques à l'intérieur du RSL de l'AT ne semble pas influencer la structure générale entre P'₃ et P₈ du RSL ou que ce dernier est capable de s'accommoder du remplacement pour adopter des conformations alternatives permettant une reconnaissance moléculaire efficace avec la furine. Le fait que le k'_{ass} de AT-EK4 est augmenté est aussi tout à fait informatif et nouveau. En effet, ceci indique que l'un ou l'autre de la constante de vitesse k_2 est augmentée (processus de reconnaissance moléculaire plus efficace) ou K_s diminue (haute affinité entre AT-EK4 et la furine) lorsque l'Arg est remplacée par la Lys à cette position. Parce que les deux chaînes latérales devraient, *a priori*, portées la même charge, l'explication pour un tel résultat pourrait provenir de l'effet électrostatique macroscopique. Nous proposons que cette augmentation dans k'_{ass} est causée par le fait que la chaîne latérale de la Lys est moins volumineuse que la chaîne latérale Arg (165 versus 200 Å² de région de surface accessible) (Miller et al., 1987). En accord avec notre

observation expérimentale, il a été rapporté que la pochette du sous-site S₂ de la furine a une taille et une profondeur limitée qui mène à la conclusion que l'origine de la prévalence d'interaction électrostatique de la Lys serait préférée (Siezen et al., 1994).

Les effets des mutations sont interprétés sous forme d'un cycle à double mutant (Horovitz, 1996), comme présenté à la Figure 6 (voir le deuxième article inséré dans la thèse), qui permet démontrer clairement la coopération des interactions entre les résidus P₆ et P₂ dans l'inhibition de la furine. Les effets de mutations sont non additifs; Les substitutions indépendantes de P₂ Pro → Arg et de P₆ Leu → Arg ont causé relativement des faibles diminutions du k_{ass} . Cependant, lorsque combinés, il y a un effet coopératif approximativement de 5 fois qui a diminué le k_{ass} avec la furine. La possibilité des interactions de longue portée entre les résidus P₂ et P₆ dans le cas de AT-EK3 qui affecte défavorablement l'habilité de la serpène à interagir avec la furine, par exemple à travers de changements subtiles dans la structure du RSL, peuvent être considérés. En plus des contributions indépendantes reportées des sous-sites S₄ et S₆ de la furine à la liaison du substrat (Krysan et al., 1999), nos résultats suggèrent que les sous-sites S₆ et S₂ de l'enzyme pourraient interagir avec le substrat d'une manière dépendante. Ceci démontrerait la flexibilité discriminatoire des sous-sites des protéases dans les patrons de reconnaissance et la spécificité d'interaction de plusieurs substrats de la furine (Molloy et al., 1999) par les effets favorables de compensation de contact ou d'interaction auxiliaire aux positions P₂ et P₆ en absence de résidus optimaux aux positions P₁ ou P₄ (Krysan et al., 1999).

L'introduction de diverses séquences de reconnaissance de la furine à l'intérieur de l'AT amènent à des changements significatifs dans le comportement de la réaction

serpine-enzyme après la bifurcation de l'embranchement de la voie du substrat suicide. Quoique les valeurs observées de SI pour les variants AT-PDX et AT-EK1 (3.6 et 2.9) indiquent que k_3 et k_4 sont similaires dans l'ampleur (vers les caractéristiques des serpines) (Gettins et al., 1996), les propriétés inhibitrices de AT-EK2 et AT-EK3 ont été profondément altérées quand l'Arg a été introduite en P₆ du RSL. En effet, nous observons une perte de la stabilité du complexe (EI*) comme révélé par la réversibilité d'inhibition (Fig. 4, C et D; voir le deuxième article inséré dans la thèse). Basé sur la structure aux rayons-X du complexe AT-trypsine (Huntington et al., 2000), nous avons examiné les explications structurales potentielles pour ce phénomène. L'environnement moléculaire entourant la Leu³⁵³ (P₆) à l'interface du feuillet β A et l'hélice hB est composé de résidus avec des chaînes latérales hydrophobiques comme dépeint par la surface moléculaire de cette pochette hydrophobique à la Fig. 7 (C et D). Quoique l'enfouissement de la Leu hydrophobique dans un tel environnement est très favorable, l'insertion d'une chaîne latérale très volumineuse et chargée est beaucoup moins probable. En effet, un tel environnement n'est pas bien adapté à contrebalancer la large perte d'énergie libre de solvation de la chaîne latérale guanidium chargée (Warshel et Åqvist, 1991) de l'Arg³⁵³ où il devrait être inséré comme une partie de la formation d'un brin complet s4A comme vu dans la structure cristalline de l'AT complexé avec la trypsine (Huntington et al., 2000). Nous observons que les positions P₁, P₂ et P₄ sont plus exposées au solvant dans la structure du complexe AT-trypsine que la position P₆ (Huntington et al., 2000), suggérant qu'un effet de désolvatation causé par l'introduction de résidus Arg (ou Lys) peut être attendue d'être moins sévère ce qui fut observé en P₆. En conséquence, nous proposons que la durée de vie de la formation du EI* avec un

résidu Arg en P₆ est improbable ou, en d'autres mots, que l'énergie de l'état de transition et EI* est très élevé comparé avec le WT (Fig. 8; le deuxième article inséré dans la thèse). Un tel effet thermodynamique mènera à une réduction et/ou une augmentation de la constante de vitesse k_4 et k_{-4} , respectivement, donc favorisant la voie du substrat comme observé expérimentalement.

Parce que nos résultats suggèrent qu'il est improbable énergétiquement de former le complexe inhibé final EI*, dans le cas de AT-EK2, AT-EK3 et AT-EK4, nous proposons que la nature des complexes de haut poids moléculaire, comme observé à la Fig. 4C, sont une forme dans laquelle le résidu P₁ de la boucle du RSL est lié d'une manière covalente avec la sérine catalytique de la protéinase pour former un complexe intermédiaire acyl-enzyme stable transitoirement. En conséquence, la protéase n'est pas à ce point écraser contre le corps de la serpine tel qu'il a été proposé pour l'interaction entre l'AT et la trypsine (Huntington et al., 2000). Cette intermédiaire (Fig. 4C) peut consister d'espèces communes à partir desquelles la séparation entre les voies du substrat et de l'inhibiteur sont présentes, quoique cet événement prendrait place plus tard dans le processus de la formation du complexe comme récemment rapporté (Luo et al., 1999).

Nous avons examiné l'effet de ces variants dans les hEK293 sur la maturation du pro-vWF. Il a été montré que ce précurseur est efficacement clivé par la furine (Wise et al., 1990), quoiqu'il reste à déterminer si d'autres SPCs participent dans la biosynthèse de cette glycoprotéine impliquée dans la coagulation. L'expression des variants AT dans ces cellules abolissent la maturation du pro-vWF comme démontré par l'absence de forme mature. Malgré la sélectivité démontrée d'AT-PDX envers la furine (Jean et al., 1998), nous croyons que les variants utilisés dans cette étude sont aussi une cible de cette

convertase dans les cellules hEK293, puisque les propriétés de ces variants envers les autres SPCs restent à être évalués. Curieusement, le comportement biochimique de ces variants observés *in vitro*, i.e. la séparation vers la voie du substrat, a été aussi observé *in cellulo* comme démontré par la sécrétion de la forme clivée dans le milieu des cellules transfectées. Ce comportement de chaque variant est aussi retrouvé *in vitro* et traduit par son SI. Ceci a permis de vérifier et de comparer l'efficacité inhibitrice de chacun des variants sur l'activité furine *in cellulo* et *in vitro*.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'introduction de différentes séquences de reconnaissance de la furine à l'intérieur de la région P₆-P₁ du RSL de l'AT a affecté le comportement général des serpins résultantes. Nous avons montré que les motifs de reconnaissance de la furine qui contiennent les déterminants moléculaires essentiels peuvent augmenter la vitesse d'association k'_{ass} d'AT pour la furine. En particulier, le résidu P₆ est très critique pour la formation d'une vie allongée du complexe serpine-protéase. En effet, le remplacement de la Leu du type sauvage en P₆ par une Arg empêche l'insertion complète de la boucle du RSL dans le feuillet β comme brin s4A et la formation d'un complexe stable de vie allongée EI* comme témoigné par la relâche rapide de serpins clivés. En conséquence, les données obtenues à partir de l'étude de ces mutations indiquent qu'un intermédiaire acyl-enzyme peut être l'espèce commune à partir duquel la séparation de la voie du substrat ou de l'inhibiteur est présente. Il est intéressant de noter que nos résultats à ceux récemment observés sur un autre inhibiteur de protéase, églïne C, un membre de la famille 1 d'inhibiteur chymotrypsine de la pomme de terre des inhibiteurs canoniques de sérines protéases (Komiyama et Fuller, 2000). En effet, les variants d'églïne C où les positions P₁, P₄ et P₆ sont remplacées par l'Arg ont

montré temporairement une inhibition de la furine suivi par un clivage protéolytique avec aucunes variations significatives au k_{ass} similaire à celui d'AT-EK2. De plus, le remplacement de résidus en P₂ à l'intérieur des deux inhibiteurs par la Lys mènent éventuellement aussi au clivage des inhibiteurs. Quoique les interactions entre la furine et la chaîne latérale P₆ Arg pourraient être responsables du comportement de type substrat d'AT-EK2 et d'AT-EK3 envers la furine, nous croyons que, pour ces serpin variants, il provient de la propriété intrinsèque de l'Arg introduite à l'intérieur du RSL dont il influencera comment le RSL viendrait s'insérer dans le feuillet β A pour devenir le brin s4A. C'est à partir de ces effets qui en résultent de la formation d'un complexe labile et, finalement, de sa protéolyse.

Le design de sites de reconnaissance optimale de la furine utilisant des inhibiteurs existants a été le point de mire de nombreuses études. Le résultat de ces efforts nous mène à croire que pour produire des inhibiteurs furine efficaces ayant des affinités subnanomolaires, des déterminants additionnels auront à être identifiés à l'extérieur des environs immédiats de la pochette de reconnaissance de l'enzyme. L'élucidation de ces déterminants peut être réalisée par le remplacement au hasard de résidus des serpins ou autres types d'inhibiteurs à l'intérieur ou à l'extérieur de leur RSL et l'évaluation de leurs propriétés inhibitrices résultantes. D'autres approches tels que le marquage d'affinité et la cartographie des sites furine interagissant avec des peptides photoréactives peuvent aussi être considérées. Ces stratégies en cours produiront de l'information cruciale à la conception d'inhibiteurs furine et d'autres inhibiteurs de convertases de type subtilisine.

La furine est une sérine protéase exprimée de manière ubiquitaire et participe aux processus les plus fondamentaux de la fonction cellulaire par l'intermédiaire de clivage

protéolytique des précurseur protéiques dans leurs entités actives. Son rôle est essentiel comme étant un modulateur protéolytique dans le développement (Molloy et al., 1999), l'innervation (Isacson et al., 2002), et la survie et la mort (Lee et al., 2001) neuronal, la communication cellule-cellule durant le développement (Mumm et al., 2000) et la différenciation (Bush et al., 2001) et l'homéostasie embryonnaire (Chen et al., 2001). Elle est aussi impliquée dans certaines maladies comme l'Alzheimer (Walter et al., 2001), la démence familiale (Kim et al., 2002), la maladie de morphogenèse embryogénique (Cui et al., 1998) et le cancer (Bassi et al., 2001). Nous avons émis comme hypothèse que l'ACT possédant des caractéristiques biochimiques et physico-chimiques que l'AT ne possède pas (Schechter et al., 1997), qui serait plus efficace à certains pHs. Avec la même stratégie, nous avons modifié la nature de certains acides aminés à l'intérieur du RSL de l'ACT pour l'ajuster à la spécificité de liaison du substrat de la furine avec différents motifs de reconnaissance (Watanabe et al., 1992).

Dans cette étude, nous avons évalué les propriétés de cinétique d'inhibition et physico-chimiques des AT et des ACT contenant divers motifs de reconnaissance à l'intérieur de la région P₇-P₁ des serpins à des environnements de pH variable. Récemment, une étude a démontré que l'enlèvement du propeptide de la furine est sensible au pH, suivant un mécanisme moléculaire d'activation autoprotéolytique ordonnée et dépendant du compartiment intracellulaire spécifique (Anderson et al., 2002). L'enlèvement du propeptide de la furine subit deux clivages spécifiques qui dépendent du pH et de la séquence du motif de la furine. Séquentiellement, le premier site de clivage (-RTKR₁₀₇-) à l'intérieur du propeptide se produit à un site consensus ou un motif canonique de la furine (RXXR ou RX(K/R)R) dans un environnement à pH neutre

du RE dans lequel la proregion est encore associée comme un complexe stable pour être transporté au TGN. De plus, cette séquence de reconnaissance est insensible au pH pour être clivée. Une fois dans le TGN, le second site de clivage de la proregion associée se produit à une séquence furine non canonique (-RGVTKR₇₅-) dans des conditions acides et la proregion est relâchée pour donner la furine active. Cette séquence de reconnaissance semble être sensible au pH pour être clivée.

Nous croyions que les petits changements de substitution entre les différents motifs de reconnaissance de la furine à l'intérieur de chaque variant auraient eu un effet sur la constante de vitesse d'interaction ou d'association (k_{ass}) avec la furine à divers pH. Or, le comportement général enzymatique de la furine est dépendante du pH où il y a seulement une ionisation simple du site catalytique et une activité maximale à pH neutre (Denault et al., 2000). Malgré une variation apparente de la variation sur k_{ass} entre les variants, il apparaît que, en évoluant le produit de k_{ass} X SI, donnant k'_{ass} (où k'_{ass} correspond à la constante de vitesse de second ordre de la formation EI', i.e avant la bifurcation de la voie en deux parties), pour normaliser la constante de vitesse d'inhibition. Ces divers motifs de reconnaissance de la furine contenus dans le RSL des variants AT et ACT n'affectent pas significativement le comportement général du k'_{ass} sur l'intervalle de pH. Donc, nos résultats révèlent que les séquences canoniques de la furine pour la spécificité enzymatique (RXXR, RXXRXXR ou RX(K/R)R) sont pH insensible pour être reconnues par la furine, i.e. que la vitesse de liaison du substrat dans la pochette catalytique de la furine est indépendante des différents motifs canoniques et n'est pas une étape limitative. Cette observation est supportée par les expériences de quench-flow où tous les variants RSL d'AT ont montré le même comportement au point

de vue du temps de formation du complexe à différent pH. Cette formation du complexe se produit très rapidement en quelques millisecondes, $< 7,2$ ms. Cependant, le temps de formation des complexes entre ACT-EK2 et la furine apparaît après ~ 1000 ms, toutefois le temps de reconnaissance est tout de même pH indépendant. Il est probable que ce ralentissement du temps de formation du complexe de la pair ACT-furine est causé par la structure du RSL de l'ACT en comparaison à l'AT. Or, la structure du RSL de l'AT a une conformation de type brin β allongé (Elliott et al., 1996) similaire à la conformation canonique des autres classes d'inhibiteurs protéiques de sérines protéinases (Bode et al., 1992), alors que celle de l'ACT est dans une conformation hélicoïdale (Wei et al., 1994). De plus, la boucle de l'AT est maintenue par des ponts hydrogènes entre la boucle et les résidus du corps de la serpine (Elliott et al., 1998), ce qui rends le RSL un plus rigide. De plus, le RSL de l'AT semble mieux épousé la structure de la pochette de liaison de la furine, car les chaînes latérales des résidus du RSL de l'AT sont déjà positionnées dans l'interface de contacts avec celles du domaine de liaison de la furine par rapport à celles de l'ACT. Ces différentes structures conformationnelles du RSL entre l'AT et l'ACT, vu dans les expériences de quench-flow, pourrait expliquer cette vitesse d'interaction ralentie puisque la conformation hélicoïdale du RSL de l'ACT doit s'adapter à la pochette de liaison du substrat de l'enzyme.

Le mécanisme d'inhibition des inhibiteurs de type serpine suivent le même chemin normal que les substrat protéique dans la réaction protéolytique, mais elle est incomplète, en s'arrêtant seulement au stage de l'intermédiaire acyl-enzyme (i.e. l'étape d'acylation, k_2) (Dans le schéma 1, où EI' est cette intermédiaire, avant le point fourchée des voies du substrat (k_3) et de l'inhibiteur (k_4)). On peut ainsi disséquer cette réaction.

De plus, comme toutes les sérines protéinases, la furine utilise ce mécanisme enzymatique pour cliver les liens peptidiques suivant un minimum de quatre étapes cinétiquement significatives : 1) liaison du substrat, 2) acylation, 3) déacylation et 4) libération du produit N-terminal. Quoiqu'il n'y a pas encore d'évidence cinétique ou aucune information établis avec certitude du comportement cinétique pré-état stationnaire de la furine, par contre, des études préliminaires ont indiquées que la furine montrait une cinétique de burst (i.e. la vitesse de réaction initiale de l'enzyme avant qu'elle atteigne sa vitesse stationnaire (à l'équilibre)) suggérant que l'étape d'acylation n'est pas limitative au clivage peptidique (Bravo et al., 1994; Krysan et al., 1999). Toutefois, Kex2 est la mieux caractérisée de cette famille d'enzyme eucaryote homologue de maturation au point de vue des bases mécanistiques cinétiques pré-état stationnaires par rapport à la furine (Rockwell et al., 2002). Dans le cas de Kex2, des fortes évidences cinétiques ont démontré que la déacylation de l'enzyme est une vitesse limitative pour les substrats qui contiennent une Arg en P₁, ce qui diffère des sérines protéinases typiques, incluant les subtilisines dégradatives, dans lesquelles l'étape de vitesse limitative a été montré d'être l'acylation (Perona et al., 1995). Cette étape de vitesse limitative pourrait expliquer la spécificité du substrat exceptionnellement élevée vue avec Kex2 et les convertases de mammifères qui sont opposées au comportement des enzymes reliées à la famille des subtilisines, qui montre une spécificité du substrat comparativement faible (Gron et al., 1992). Avec les valeurs de k'_{ass} des différents variants du RSL des serpinines sur l'intervalle de pH (Tableau II), nous montrons que les étapes de la liaison du substrat et d'acylation ne sont pas une vitesse limitative et sont insensibles au pH durant l'interaction initiale, malgré la variété des sites de reconnaissance de la furine.

Alors, quel est le phénomène mécanistique et cinétique qui est responsable de l'augmentation de la quantité et de la stabilité du complexe inhibiteur irréversible à haut pH? Le meilleur exemple est le comportement cinétique de AT-EK2 (RERIPR) en réaction avec la furine. Tel que nous l'avions démontré auparavant (Dufour et al., 2001) avec une progression dans le temps de la formation du complexe entre AT-EK2 et la furine, et supporté par les expériences de quench-flow, la majorité de la furine, à pH neutre, est complexée avec AT-EK2 très rapidement (l'ordre du millisecondes). Par la suite, ces complexes ont une stabilité de quelques minutes pour régénérer la furine active causé par l'insertion de l'Arg P₆ du RSL, à l'intérieur de la structure du feuillet β , qui est répulsée de l'environnement hydrophobique caractéristique du corps centrale de la serpine. Cette répulsion permet à poursuivre le mécanisme d'hydrolyse du lien peptidique. Malgré cette instabilité du complexe AT-EK2-furine formé, ceci n'explique pas complètement l'augmentation de la stabilité du complexe dans le temps à haut pH par rapport à bas pH (Figure 3C). Nous suggérons, selon les bien-fondés de nos résultats précédents et actuels, que ce phénomène cinétique est causé par la vitesse de déacylation du complexe acyl-enzyme. Comme Kex2, la furine présente un comportement cinétique dans lequel l'étape de déacylation est une vitesse limitative et pH dépendante. En plus, ceci pourrait expliquer la diminution des valeurs de SI de AT-EK2 et de tous les autres variants RSL d'AT à haut pH. Visuellement, on voit cette légère augmentation apparente avec les variants d'ACT (Figure 4). Les valeurs élevées de SI pour ACT-EK2 à pH élevé, ACT-EK3 et ACT-EK5 est causé par la lenteur de former un complexe inhibiteur irréversible avec la furine (données non montrées). Dans ce cas, la déacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme a le temps de se briser avant que la boucle s'insère

correctement dans le corps de la serpine et que la distorsion catalytique de l'enzyme se produit pour le conduire vers le complexe irréversible final (Egelund et al., 2001, ; Huntington et al., 2000), durant l'étape de translocation de la protéinase (Stratikos et al., 1999).

À pH 6.0, nous apercevons une forme qui est seulement révélée par les anticorps anti-His-tag et anti-ACT, et non par l'anticorps anti-furine CRR (MON-152), pour AT-PDX, AT-EK1, AT-EK4 et ACT-EK2. De plus, il ne se retrouve pas à d'autres pHs et pour d'autres variants. Analysant la séquence primaire et la structure cristalline (Henrich et al., 2003) de la furine, le seul site potentiel accessible dans la séquence et la structure qui pourrait être clivé par une furine active en *trans* à pH 6.0 (la constante k_6 , schéma 1) se localise au début du brin β P β 1b et en avant du brin β P β 2 du P-domaine, où la séquence est K₄₅₉DIGKR₄₆₄[↓]LEVRK₄₆₉. Il y a plusieurs raisons que ce site de clivage potentiel est excisé à ce point, i.e. à l'Arg₄₆₄ : 1) la furine peut cliver à la Lys₄₆₉ comme P₁ (Duguay et al., 1997) mais ceci est exclu à cause qu'il y a un contact défectueux en P₄ (Glu) dans cette séquence par rapport à la séquence de ce peptide fluorogénique AcRARYKK-MCA (Krysan et al., 1999); 2) Arg₄₆₈ comme P₁ en avant de cette Lys ne peut être cliver à cause qu'il y a été montré que une Lys en P'₁ empêche le clivage par la furine (Brennan et al., 1994a); 3) comme présenté par la structure cristalline, ce clivage de site non canonique ([K/R]XXX[K/R]R) pourrait se produire à ce site à pH 6.0 (Thomas, 2002) à cause qu'il est entre deux brins β et très accessible pour une autre protéinase, où la structure de l'enzyme est entièrement désorganisée dans le complexe final serpine-protéase. De plus, il est aussi le seul endroit qui produit un fragment de 72

kDa, qui représente le complexe inhibiteur irréversible clivé de l'AT-domaine catalytique de la furine sans P-domaine et sans la région riche en cystéine (CRR).

Pour AT-EK2, AT-EK3, AT-EK5 et ACT-EK3, on ne retrouve pas ce fragment. L'Arg en P₆ d'AT-EK2 et d'AT-EK3 pourrait être responsable de l'insertion de la boucle qui ne peut s'insérer correctement dans le corps de la serpine pour distordre le domaine catalytique de la furine dans une forme finale irréversible (Huntington et al., 2000) mais elle est plutôt répulsée. L'enzyme peut alors compléter la réaction de déacylation permettant l'entrée d'une molécule d'eau qui prouve que les complexes sont dans une forme intermédiaire entre l'état final distordu (EI*) et l'intermédiaire acyl-enzyme (EI'), i.e. que le site actif de l'enzyme n'est pas désorganisée mais toujours catalytiquement actif. Il a été démontré que la susceptibilité protéolytique induite par la serpine envers sa protéase cible à l'intérieur du complexe final ait lieu : il faut que la structure catalytique de l'enzyme doit d'abord se soumettre à une distorsion de la pochette de liaison du substrat et du trou de l'oxyanion (Egelund et al., 2001) afin que certains sites de protéolyse soient accessibles par une autre protéase. Donc, ce site de clivage est protégé. De plus, cette observation permet de supporter fortement qu'il est possible de considérer que l'insertion de la boucle pour la formation du complexe irréversible (k_4) peut être réversible (k_{-4}) sans passer par la constante de vitesse k_5 comme montré par le Schéma 1 (Nash et al., 2000 ; Dufour et al., 2001).

Dans le cas d'ACT-EK5, il a une autre forme de complexes clivés à 102 kDa qui est seulement détectée par l'anticorps anti-furine, avec une intensité marquée à pH 7.0-8.0 (Figure 4), où l'activité catalytique de la furine est à son plus haut. Ce clivage ne peut être produit sur la furine à cause que le domaine CRR reste intact. Il semble que ce

clivage protéolytique se produit sur la serpine ACT, en plus sur l'hélice F (hF) de la serpine. Cette hF pourrait jouer un rôle essentiel dans le mécanisme d'inhibition de la protéase en s'ouvrant et se fermant au passage de la boucle durant son insertion à l'intérieur de la structure du feuillet β A du corps de la serpine (Gettins, 2002), puisqu'elle est en avant de cette structure. Analysant la séquence primaire et la structure tertiaire de l'ACT, le seul site de clivage accessible et potentiel pour la furine est localisé dans le hF, où la séquence est $K_{161}NGTR_{165}↓G$. De plus, cette séquence est plus sensible à pH 7.0-8.0, un motif non canonique de la furine. Cette séquence correspondante dans le hF de l'AT est $E_{162}KGTQG_{166}K$, où il y a Gly plutôt qu'un Arg comme dans l'ACT, c'est pourquoi on ne retrouve pas cette espèce avec les variants AT. L'endroit du clivage au niveau du hF de l'ACT correspond bien au fragment 102 kDa, qui représente le complexe clivé de hFur/714-ACT clivé dans le hF. Ceci pourrait expliquer, en effet, que la boucle modifiée de l'ACT-EK5 durant son insertion complète et la vitesse d'insertion de la boucle sont perturbées. Alors, le hF est plus accessible et plus susceptible à la protéolyse puisque l'hélice ne peut retourner à sa position initiale pour se fermer sur la boucle insérée. La distorsion du domaine catalytique de la protéase pourrait toujours se produire, puisque la protéase liée à la serpine est bloquée par l'autre enzyme qui clive hF. Il y a aussi la possibilité de la régénération de l'enzyme active avant que le site actif de l'enzyme soit dans un état distordu. Avec ce mécanisme suggéré, il résulte de trois espèces moléculaires différentes : un complexe irréversible finale, un complexe hFur/714-ACT clivé et une enzyme active régénérée. Les valeurs mesurées de SI d'ACT-EK5 pourraient refléter ce comportement.

Nous avons examiné les effets de ces variants d'AT et d'ACT dans les cellules hEK293 de type sauvage et les cellules hEK293-C4 sur la maturation du pro-vWF. Il a été montré que ce précurseur est efficacement clivé par la furine (Wise et al., 1990). L'expression des variants d'AT et d'ACT dans les cellules abolissent la maturation du pro-vWF comme démontré par l'absence de forme mature (Figure 7A). Le comportement biochimique des variants RSL d'AT observé *in vitro* est en accord avec les valeurs SI pour chacun des variants dans la séparation vers la voie du substrat comme observé *in cellulo* de la forme clivée dans le milieu des cellules transfectées. Comme ces variants sont exprimés dans ces cellules, ils traversent la même voie des compartiments cellulaires que la biosynthèse de la furine (Thomas, 2002) dans la voie constitutive pour être sécrété dans le milieu. Ces compartiments cellulaires sont plutôt acide (TGN) ou neutre (ER). Sous des conditions de surexpression de la furine dans les cellules hEK293-C4, il a été détecté, dans le milieu, deux formes protéiques des variants ATs : une forme complexée ou clivée, avec l'absence de serpine non-clivée (Figure 7B). Dans le cas des variants d'ACT, ceci n'a pas été retrouvé dans lequel il y avait seulement des complexes serpine-enzyme et des serpines non-clivées. Dans un environnement acide, les propriétés physico-chimique de l'ACT lui permet d'être plus stable que l'AT (Schechter et al, 1997). Ceci suggère que le comportement de la furine dans son environnement naturel de compartiments intracellulaires dans lesquels elle circule a un effet très important sur son activité de maturation.

En conclusion, nos résultats démontrent que la reconnaissance à divers pHs de différents motifs canoniques de la furine introduits à l'intérieur de la région P₇-P₁ du RSL de l'AT et de l'ACT est pH indépendant. C'est la première fois au point de vu de la

cinétique enzymatique qu'on révèle que l'étape d'acylation dans le comportement cinétique de la furine n'est pas une vitesse limitative mais plutôt l'étape déacylation, comme son homologue Kex2 (Rockwell et al., 2002). De plus, cette vitesse de déacylation est pH dépendante comme montré par l'augmentation de la stabilité des complexes variants RSL d'AT et d'ACT-furine à haut pH, particulièrement par le variant AT-EK2. L'aspect de l'étape de réversibilité du complexe inhibitrice irréversible (EI*) vers l'intermédiaire acyl-enzyme (EI') est renforcé par les nouvelles données et celles de l'article précédente (Dufour et al., 2001) fournie par le comportement particulier d'AT-EK2.

Avec la venue de la structure cristallographique du domaine catalytique et du P-domaine de la furine (Henrich et al., 2003) pour le design optimal d'agents antiprotéolytiques de la furine en utilisant les inhibiteurs existants à partir de ces informations, il faudrait considérer le comportement cinétique enzymatique et l'environnement du pH en opposition aux motifs de reconnaissance canoniques et non canoniques présentés par les substrats dans lequel la furine les mature, comme les précurseurs protéiques des pathogènes bactériens ou viraux. Par exemple, l'exotoxine A de *Pseudomonas* est maturée dans endosomes acides (Chiron et al., 1994; Corboy et al., 1997) tandis que l'antigène protecteur de *Anthraxis* est clivé à la surface cellulaire par la furine (neutre à légèrement basique) (Collier et al., 2003). Il sera intéressant d'étudier la dépendance du pH de motifs de reconnaissance sur la régulation d'activation des substrats de la furine. Ceci pourrait aider pour comprendre les déterminants qui régule l'activité, le motif de spécificité et la dépendance du pH de la furine afin de l'utiliser au design de nouveaux inhibiteurs de la furine.

Le désavantage des peptides avec un groupement chlorométhylcétone est leur toxicité à concentration élevée. Par contre, l'inhibiteur peptidique polyarginine est petit, facile à synthétiser, et son action est réversible, puisqu'après un certain temps ce inhibiteur est clivé par la furine. Il serait très avantageux dans la régulation systémique de l'activité furine dans certaines maladies hormonales sans affecter l'activité furine de base. Dans le cas des pathologies bactériennes et virales où l'activité de la furine doit être abolie afin d'éviter la propagation et d'atténuer la virulence du pathogènes, la réversibilité et la demi-vie de ce peptide serait un inconvénient. Cependant, sa toxicité, sa pharmacocinétique, son index pharmacologique, sa demie-vie et son élimination dans le sang n'est pas connu.

Avec les inhibiteurs protéiques du mécanisme standard, l'avantage principal est la possibilité de modifier leur spécificité et leur structure afin d'optimiser les contacts entre inhibiteur-protéase. De plus, il a aussi leur stabilité, leur petite taille et leur réversibilité mais avec un K_i très petit. Ils sont inhibiteurs du type «tight-binding». Cependant, la plupart provient dans d'autres espèces. L'inconvient serait leur élimination dans l'organisme, à cause de leur stabilité élevée.

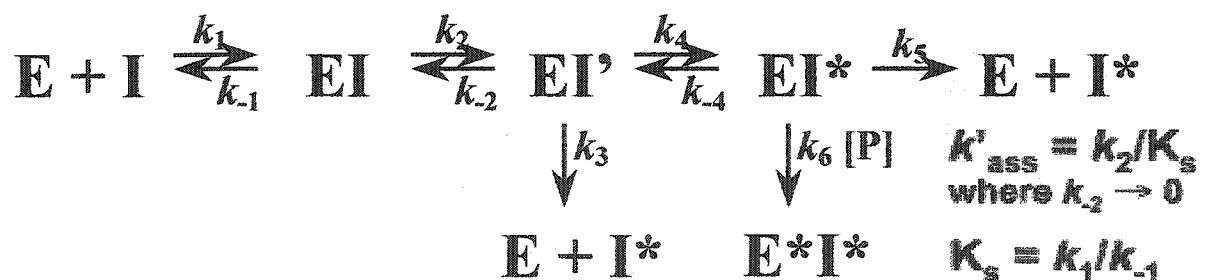
Les serpins sont déjà présentes dans plusieurs processus biochimiques de régulation protéolytique dans le corps humain. Il est facile de modifier leur spécificité pour une protéase donnée. Par contre, l'optimisation des contacts serpins-protéases, par rapport aux inhbiteurs du mécanisme standard, est plus difficile à appliquer. Les modifications apportées pourraient toucher le mécanisme d'inhibition caractéristique des serpins, i.e. la formation d'un complexe stable et irréversible. Ces particularités mécanistique d'inhibition des serpins sont un atout pour le traitement des pathologies

bactériennes et virales, puisqu'elles abolisseraient complètement l'activité de la furine sans que ces infections progresseraient dans l'organisme. De plus, les complexes serpine-furine pourraient être éliminés par l'organisme, étant donné il y a des récepteurs de clairance pour éliminer ces types de complexe.

Conclusion

Les objectifs de ces travaux au cours des études doctorales étaient de construire des inhibiteurs protéiques, de comprendre et d'élucider les mécanismes moléculaires d'inhibition de la furine, à partir d'inhibiteurs existants.

Auparavant, le groupe de Anderson et *al.* (1993) avait construit un variant structurel de l' α_1 -antitrypsine dans lequel il avait modifié la boucle du site réactif (RSL) en introduisant la séquence de reconnaissance minimale (RXXR) de la furine (AIPM³⁵⁸ → RIPR³⁵⁸) afin de changer la spécificité de l'inhibiteur. Ce variant structurel, appelé AT-PDX, a été capable d'inhiber fortement l'activité protéolytique de la furine en bloquant la formation de syncytium des cellules causée par le virus du VIH. Cependant, cet agent anti-furine modifié à partir du RSL de l' α_1 -antitrypsine conservait-il les mêmes propriétés inhibitrices que celles des membres de la famille des serpins inhibitrices.



Au cours de mes travaux de la maîtrise, nous avons montré qu'AT-PDX inhibait la furine avec les mêmes étapes de cinétique d'inhibition que le mécanisme d'inhibition du substrat suicide des serpins inhibitrices (voir le schéma représentant le mécanisme d'inhibition des serpins par l'entremise de la voie fourchée du substrat suicide), ainsi que les mêmes propriétés biochimiques d'inhibition que celles-ci. Voici les différentes

étapes principales du mécanisme cinétique d'inhibition, en prenant AT-PDX comme exemple pour décrire le déroulement de l'action de la serpine sur la protéase cible. Les deux arginines en position P_4 et P_1 du RSL permettent au variant AT-PDX d'être reconnu sélectivement par le domaine catalytique et de liaison du substrat de la furine pour un former un complexe non covalent, appelé complexe de Michaelis (EI). Comme dans la première étape du mécanisme d'hydrolyse d'un substrat peptidique par une sérine protéase, la sérine active de la furine attaque le lien peptidique $P_1-P'_1$ en C-terminal de l'arginine P_1 , ce qui produit la libération du fragment N-terminal du substrat et la formation du lien acyle entre la protéase et AT-PDX. Ce complexe est appelé l'intermédiaire acyl-enzyme (EI'). Cet intermédiaire EI' est le point de bifurcation entre deux voies possibles que peut suivre EI' : la voie du substrat (représentée par la constante de vitesse k_3) ou la voie de l'inhibiteur (représenté par la constante k_4). Dans la voie du substrat, l'hydrolyse du peptide se poursuit normalement par la déacylation du lien acyl-enzyme, causée par l'entrée d'une molécule d'eau dans le site actif de l'enzyme en attaquant le lien acyl-enzyme, pour donner la furine active régénérée (E) et AT-PDX clivé (I^*). Par contre, dans la voie de l'inhibiteur, le clivage de la boucle (RSL), exposée au-dessus du corps de la serpine, par la protéase amène à la libération d'une énergie libre qui permet la translocation de la protéase par la boucle liée à elle vers le bas du corps de la serpine en s'insérant comme un brin β central à l'intérieur de la large structure du feuillet β A. Ce mouvement de la boucle transportant la protéase sur son corps provient de l'énergie de tension contenue dans l'état natif métastable (état stressé) de la serpine. En clivant le lien peptidique, la protéase permet à la serpine d'aller vers son état très stable (état relaxé). Toute cette énergie de tension libérée est aussi utilisée, pas seulement

pour transporter la protéase, pour provoquer la déformation du site catalytique de l'enzyme, éloigner le résidu P_1 de la triade catalytique, ainsi bloquer l'étape de déacylation dans l'hydrolyse du substrat. À la fin de la réaction cinétique, nous obtenons un complexe covalent irréversible (EI^*) entre AT-PDX et la furine.

Nous avons montré qu'AT-PDX était capable d'inhiber l'activité enzymatique de la furine d'une manière concentration dépendante en présence d'un substrat fluorogénique, d'abolir la maturation du précurseur de l'antigène protecteur de l'anthrax et de former un complexe irréversible à long terme et un complexe stable en présence de SDS, une caractéristique typique des serpine. Ce qui démontre que la modification du RSL de l' α_1 -antitrypsine en introduisant des résidus arginines à des endroits spécifiques pour se plier aux exigences de spécificité du substrat de la furine n'altère pas les principales propriétés biochimiques d'inhibition de la serpine.

À partir du prototype AT-PDX, nous avons construit différents variants structurels en introduisant dans le RSL de l' α_1 -antitrypsine et de l' α_1 -antichymotrypsine divers motifs de séquence avec des arginines et des lysines à des endroits spécifiques qui sont reconnus par la furine. Nous avons démontré que la substitution de certains résidus par des acides aminés basiques à des positions précises du RSL peuvent affecter le comportement biochimique de la serpine dans sa capacité de suivre soit la voie du substrat (k_3) ou soit la voie de l'inhibiteur (k_4) en réaction avec la protéase cible. Avec les expériences de quench-flow, nous avons montré que la vitesse d'interaction (EI) vers la formation du complexe stable (EI^*) se fait très rapidement pour les variants de l' α_1 -antitrypsine, en-dessous de 7,2 ms, indépendamment du pH. Par contre pour les variants de l' α_1 -antichymotrypsine, cette vitesse d'interaction et ce temps de formation du

complexe est plus lent. L'apparition du complexe se produit au-dessus de ~ 1000 ms, indiquant que l'interaction entre le RSL et le domaine de liaison du substrat de la furine semble se produire moins efficacement que celle avec les variants de l' α_1 -antitrypsine. Les valeurs de k'_{ass} (le produit des valeurs de k_{ass} X SI) pour chaque variant de l'étude ont révélé que la vitesse d'association des divers motifs de reconnaissance contenus à l'intérieur du RSL des serpins en réaction avec la furine est indépendante du pH, puisque les sites de reconnaissance de ces variants sont des motifs canoniques furine. À l'instar de la cinétique pré-stationnaire de Kex2, nos résultats nous indiquent que l'étape d'acylation n'est pas limitative pour former l'intermédiaire acyl-enzyme (EI') entre les différents variants et la furine, avant le point de séparation des deux voies du mécanisme d'action d'une serpine.

Nous avons démontré que, malgré de hautes valeurs de SI de certains variants, tous les variants ont la capacité de former un complexe irréversible stable avec la furine. Cette capacité de former un complexe covalent stable peut être influencée par le pH. Nos résultats ont montré que l'arginine en P_6 contenue à l'intérieur du RSL d'AT-EK2 et d'AT-EK3 amenait à une instabilisation du complexe à court terme. Le variant AT-EK2 a la particularité d'interagir très rapidement et de former un complexe stable de quelques minutes ($t_{1/2} \sim 2,5$ min.). L'insertion du RSL avec une arginine en P_6 dans un environnement hydrophobe de la structure centrale du feuillet β A provoque la répulsion de la boucle hors du corps de la serpine. Ceci permet de régénérer l'enzyme active et de libérer une serpine clivée. De plus, nous avons montré que la stabilité du complexe formé entre AT-EK2 et la furine augmente en fonction de l'augmentation de la basicité du milieu, de même que pour les autres variants de l' α_1 -antitrypsine à des degrés différents.

Toutefois, il semble constant pour les variants de l' α_1 -antichymotrypsine. Nos résultats nous révèlent, comme nous montre le comportement d'AT-EK2, que cette augmentation de stabilité du complexe est probablement causée par une diminution de la vitesse de déacylation. Ce ralentissement de l'étape de déacylation est reflété par la diminution des valeurs de SI des variants de l' α_1 -antitrypsine. À l'instar de la cinétique d'hydrolyse de Kex2, l'étape de déacylation de la furine est donc dépendante du pH et limitative. Nos résultats nous ont aussi montré que les complexes d'AT-PDX, d'AT-EK1, d'AT-EK4, d'ACT-EK2 formés avec la furine à pH 6.0 peuvent être clivés par une autre furine en trans, à un site localisé dans le domaine P de la furine complexée (voie k_6). Dans le cas avec ACT-EK5, à différent pH, le site de clivage se retrouve sur l'hélice F de l' α_1 -antichymotrypsine.

En outre, le comportement particulier d'AT-EK2 nous montre que le complexe EI* peut être réversible (k_4), confirmant une hypothèse émise par Nash et al., 2000. Cependant, EI* est dans un état d'énergie libre plus haute et instable par rapport au complexe typique élastase- α_1 -antitrypsine. Le complexe EI* retourne (passant par k_4) vers l'intermédiaire EI' et, ensuite, prend la voie du substrat (k_3) puisque l'insertion de la boucle ne peut pas se produire correctement. Il est possible qu'il y a différents intermédiaires entre EI' et EI*.

Au point de vue de l'inhibition *in cellulo*, les variants de l' α_1 -antichymotrypsine ont montré une capacité d'inhiber l'activité protéolytique de la furine sur la maturation du pro-vWF sans être clivés, même dans les cellules hEK293-C4 dans lesquelles la furine est surexprimée. En comparaison, dans les mêmes conditions de surexpression de la furine, les variants de l' α_1 -antitrypsine ont tout été clivé, sans exception, dans le milieu

extracellulaire. Nos résultats ont révélé que les conditions naturelles du milieu des compartiments intracellulaires peuvent influencer les propriétés enzymatiques de la furine ainsi que les propriétés physico-chimiques de l'inhibiteur en interaction avec sa protéase cible.

En collaboration avec le laboratoire du Dr. Cantin, nous avons montré que la PEGylation spécifique du groupement thiol de la cystéine 232 de l' α_1 -antitrypsine prolongeait et augmentait sa stabilité dans le sang et dans les poumons. De plus, cette forme PEGylée de l' α_1 -antitrypsine avait une meilleure protection que l' α_1 -antitrypsine glycosylée (isolée du sang) contre l'hémorragie induite par l'élastase leucocytaire dans le poumon. Cette technique de PEGylation pourrait être appliquée pour les variants de l' α_1 -antitrypsine et de l' α_1 -antichymotrypsine qui inhibent la furine. Ces agents anti-furine PEGylés permettraient de diminuer ou d'atténuer les symptômes de morbidité de certaines pathologies dans lesquels plusieurs pathogènes opportunistes infectieux aggravent et compromettent les conditions de vie et de santé du patient.

Ces études ont apporté certains éclaircissements sur le mécanisme d'inhibition des serpins et de la cinétique d'hydrolyse du substrat par la furine et sur l'influence du pH sur les divers motifs canoniques de la furine. Il sera intéressant d'élucider l'influence du pH sur la maturation de certains substrats protéiques de la furine qui possèdent un motif de reconnaissance non canonique de la furine. Ces études et l'établissement de la structure cristallographique récente de la furine permettront d'établir une manière d'améliorer le design d'un inhibiteur anti-furine, selon l'environnement de pH dans lequel la furine active l'agent pathogène, selon le motif de reconnaissance choisi et selon les propriétés biochimiques de l'inhibiteur protéique choisi. Cette recherche permettrait

d'être appliquée dans des traitements thérapeutiques contre les maladies respiratoires (emphysème, fibrose kystique) et pour les grands brûlés où un agent pathogène opportuniste profite et aggrave le caractère de morbidité de la maladie.

RÉFÉRENCES

Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T., van der Goot, F.G. (1998) The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J. Biol. Chem.* **273**: 32656-32661.

Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S., Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J. Biol. Chem.* **268**: 24887-24891.

Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S., Thomas, G. (2002) The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J. Biol. Chem.* **277**: 12879-12890.

Anglikar, H. (1995) Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J. Med. Chem.* **38**: 4014-4018.

Backovic, M., Stratikos, E., Lawrence, D. A., Gettins, P. G. W. (2002) Structural similarity of the covalent complexes formed between the serpin plasminogen activator inhibitor-1 and the arginine-specific proteinases trypsin, LMW u-PA, HMW u-PA, and t-PA: use of site-specific fluorescent probes of local environment. *Protein Sci.* **11**: 1182-1191.

Baker, D. (1998) Metastable states and folding free energy barriers. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 1021-1024.

Ballard, J., Sokolov, Y., Yuan, W.L., Kagan, B.L., Tweten, R.K. (1993) Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol. Microbiol.* **10**: 627-34.

Band, A.M., Maatta, J., Kaariainen, L., Kuismanen, E. (2001) Inhibition of the membrane fusion machinery prevents exit from the TGN and proteolytic processing by furin. *FEBS Lett.* **505**: 118-124.

Banda, M. J., Rice, A. G., Griffin, G. L., Senior, R. M. (1988) Alpha 1-proteinase inhibitor is a neutrophil chemoattractant after proteolytic inactivation by macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* **263**: 4481-4484.

Basak, A., Toure, B.B., Lazure, C., Mbikay, M., Chretien, M., Seidah, N.G. (1999) Enzymic characterization in vitro of recombinant proprotein convertase PC4. *Biochem J.* **343**:29-37.

Bass, J., Turck, C., Rouard, M., Steiner, D.F. (2000) Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**: 11905-11909.

Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J.A., Klein-Szanto, A.J. (2001) Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* **31**: 224-232.

Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., Klein-Szanto, A.J. (2001) Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**: 10326-10331.

Beauregard, K.E., Collier, R.J., Swanson, J.A. (2000) Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell. Microbiol.* **2**: 251-258.

Belin, D., Wohlwend, A., Schleunung, W.-D., Kruithof, E. K. O., Vassalli, J.-D. (1989) Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2. *EMBO J.* **8**: 3287-3294.

Bissonnette, L., Charest, G., Longpre, J.M., Lavigne, P., Leduc, R. (2004) Identification of furin pro-region determinants involved in folding and activation. *Biochem J.* **379**:757-763.

Björk, I., Jackson, C. M., Jönrvall, H., Lavine, K. K., Nording, K., Salsgiver, W. J. (1982) The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically cleaved form of the inhibitor from complexes with factor IXa, factor Xa, and thrombin. *J. Biol. Chem.* **257**: 2406-2411.

Bode, W., Papamokos, E., Musil, D. (1987) The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. Structural analysis, subtilisin structure and interface geometry. *Eur. J. Biochem.* **166**: 673-92.

Bode, W., Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**: 433-451. Review.

Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J., Bonifacino, J.S. (1994) The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J. Cell. Biol.* **126**: 1157-1172.

Boudier, C., Bieth, J. G. (2001) The reaction of serpins with proteinases involves important enthalpy changes. *Biochemistry.* **40**: 9962-9967.

Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., Young, J.A. (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature.* **414**: 225-229.

Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., Fuller, R.S. (1994) Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J. Biol. Chem.* **269**: 25830-25837.

Brennan SO, Nakayama K. (1994)a Cleavage of proalbumin peptides by furin reveals unexpected restrictions at the P2 and P'1 sites. *FEBS Lett.* **347**: 80-84.

Brennan, S.O., Nakayama, K. (1994)b Furin has the proalbumin substrate specificity and serpin inhibitory properties of an in situ hepatic convertase. *FEBS Lett.* **338**:147-151

Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J. (1990) Thomas G. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell. Biol.* **111**: 2851-2859.

Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J.B., Leduc, R., Weinmaster, G. (2001) Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1. *Dev. Biol.* **229**: 494-502.

Calugaru, S. V., Swanson, R., Olson, S. T. (2001) The pH dependence of serpin-proteinase complex dissociation reveals a mechanism of complex stabilization involving inactive and active conformational states of the proteinase which are perturbable by calcium. *J. Biol. Chem.* **276**: 32446-32455.

Cameron, A., Appel, J., Houghten, R.A., Lindberg, I. (2000) Polyarginines are potent furin inhibitors. *J. Biol. Chem.* **275**: 36741-36749.

Cameron, A., Apletalina, E.V., Lindberg, I. in *The Enzymes*, Vol. XXII, 3rd Ed.; Dalbey, R.E.; Sigman, D.S., Eds; Academic Press: San Diego, 2001; p.291.

Carr, C.M., Chaudhry, C., Kim, P.S. (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 14306-14313.

Carrell, R. W., Travis, J. (1985) *Trends. Biol. Sci.* **10**: 20.

Carrell, R. W., Stein, P. E., Fermi, G., Wardell, M. R. (1994) Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin. *Structure.* **2**: 257-270.

Chaillan-Huntington, C.E., Gettins, P.G.W., Huntington, J.A., Patston, P.A. (1997) The P₆-P₂ region of serpins is critical for proteinase inhibition and complex stability. *Biochemistry* **36**: 9562-9570.

Chen, C.D., Huff, M.E., Matteson, J., Page, L., Phillips, R., Kelly, J.W., Balch, W.E. (2001) Furin initiates gelsolin familial amyloidosis in the Golgi through a defect in Ca^{2+} stabilization. *EMBO J.* **20**: 6277-6287.

Chen, Y., Molloy, S.S., Thomas, L., Gambee, J., Bachinger, H.P., Ferguson, B., Zonana, J., Thomas, G., Morris, N.P. (2001) Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**: 7218-7223.

Cheng, M., Watson, P.H., Paterson, J.A., Seidah, N., Chretien, M., Shiu, R.P. (1997) Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int. J. Cancer.* **71**:966-971.

Chiron, M.F., Fryling, C.M., and FitzGerald, D.J. (1994) Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J. Biol. Chem.* **269**: 18167-18176.

Chrétien, M., Hi, C.H. (1967) Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotrophic hormone from sheep pituitary glands. *Can. J. Biochem.* **45**: 1163-1174.

Collier, J.R., and Young, J.A.T. (2003) Anthrax toxin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 45-70.

Cooperman, B.S., Stavridi, E., Nickbarg, E., Rescorla, E., Schechter, N.M., Rubin, H. (1993) Antichymotrypsin interaction with chymotrypsin. Partitioning of the complex. *J. Biol. Chem.* **268**: 23616-23625.

Corboy, M.J. and Draper, R.K. (1997) Elevation of vacuolar pH inhibits the cytotoxic activity of furin-cleaved exotoxin A. *Infect. Immun.* **65**: 2240-2242.

Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., Christian, J.L. (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* **17**: 4735-4743.

Dahlen, J.R., Foster, D.C., Kisiel, W. (1997) Human proteinase inhibitor 9 (PI9) is a potent inhibitor of subtilisin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**: 329-333.

Dahlen, J.R., Jean, F., Thomas, G., Foster, D.C., Kisiel, W. (1998) Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J. Biol. Chem.* **273**: 1851-1854.

Day, R., Lazure, C., Basak, A., Boudreault, A., Limperis, P., Dong, W., Lindberg, I. (1998) Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity. *J Biol Chem.* **273**: 829-836.

Denault, J.B., Claing, A., D'orléans-Juste, P., Sawamura, T., Tido, T., Masaki, T. Leduc, R. (1995) Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* **362**: 276-280.

Denault, J.B., Lazure, C., Day, R., and Leduc, R. (2000) Comparative characterization of two forms of recombinant human SPC1 secreted from Schneider 2 cells. *Protein. Expr. Puri.f* **19**: 113-124.

Denault, J.-B., Bissonnette, L., Longpre, J.-M., Charest, G., Lavigne, P., Leduc, R. (2002) Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Lett.* **527**:309-314.

Djie, M.Z., Le Bonniec, B.F., Hopkins, P.C.R., Hipler, K., Stone, S.R. (1996) Role of the P2 residue in determining the specificity of serpins. *Biochemistry.* **35**: 11461-11469.

Doolittle, R. F. (1983) Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science* **222**:417-419.

Drews, R., Paleyanda, R.K., Lee, T.K., Chang, R.R., Rehemtulla, A., Kaufman, R.J., Drohan, W.N., Lubon, H. (1995) Proteolytic maturation of protein C upon engineering the mouse mammary gland to express furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10462-10466.

Dufour, E.K., Denault, J.B., Hopkins, P.C., and Leduc, R. (1998) Serpin-like of α_1 -antitrypsin Portland towards furin convertase. *FEBS Lett.* **426**: 41-46.

Dufour, E.K., Denault, J.B., Bissonnette, L., Hopkins, P.C., Lavigne, P., and Leduc, R. (2001) The contribution of arginine residues within the P6-P1 region of α_1 -antitrypsin to its reaction with furin. *J. Biol. Chem.* **276**: 38971-38979.

Duguay, S.J., Milewski, W.M., Young, B.D., Nakayama, K., Steiner, D.F. 1997. Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* **272**: 6663-6670.

Egelund, R., Peterson, T.E., Andreasen, P.A. (2001) A serpin-induced extensive proteolytic susceptibility of urokinase-type plasminogen activator implicates distortion of the proteinase substrate-binding pocket and oxyanion hole in the serpin inhibitory mechanism. *Eur. J. Biochem.* **268**: 673-685.

Elliott, P. R., Lomas, D. A., Carrell, R. W., Abrahams, J. P. (1996) Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 676-681.

Elliott, P. R., Abrahams, J. P., Lomas, D. A. (1998) Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J. Mol. Biol.* **275**: 419-425. Review.

Elliott, P. R., Bilton, D., Lomas, D. A. (1998) Lung polymers in α_1 -antitrypsin deficiency-related emphysema. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **18**: 670-674.

Fa, M., Bergstrom, F., Hagglof, P., Wilczynska, M., Johansson, L., Ny, T. (2000) The structure of a serpin-protease complex revealed by intramolecular distance measurements using donor-donor energy migration and mapping of interaction sites. *Structure Fold. Des.* **8**: 397-405.

Feldmann, H., Volchkov, V.E., Volchvoka, V.A., Klenk, H.D. (1999) The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis. *Arch. Virol. Suppl.* **15**: 159-169. Review.

Fersht, A.R. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed.; W.H., Freeman & Co.: New York, 1985; p. 412.

Fish, W.W., Orre, K., Björk, I. (1979) Routes of thrombin action in the production of proteolytically modified, secondary forms of antithrombin-thrombin complex. *Eur. J. Biochem.* **101**: 39-44.

Fish, W. W., Björk, I. (1979) Release of a two-chain form of antithrombin from the antithrombin-thrombin complex. *Eur. J. Biochem.* **101**: 31-38.

Fugere, M., Limperis, P.C., Beaulieu-Audy, V., Gagnon, F., Lavigne, P., Klarskov, K., Leduc, R., Day, R. (2002a) Inhibitory potency and specificity of subtilase-like pro-protein convertase (SPC) prodomains. *J. Biol. Chem.* **277**: 7648-56.

Fugere, M., Day, R. (2002) Inhibitors of the subtilase-like pro-protein convertases (SPCs). *Curr Pharm Des.* **8**:549-562. Review.

Fuller, R.S., Brake, A.J., Thorner, J. (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science.* **246**: 482-486.

Futamura, A., Stratikos, E., Olson S.T., Gettins, P.G.W. (1998) Change in environment of the P1 side chain upon progression from the Michaelis complex to the covalent serpin-proteinase complex. *Biochemistry.* **37**: 13110-13119.

Gettins, P.G.W., Patston, P.A., Olson, S.T., *Serpins: Structure, Function and Biology*, R.G. Landes Co.: Austin, 1996.

Gettins, P.G.W. (2002) The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism. *FEBS Lett.* **523**: 2-6.

Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T., Pepperkok, R. (1999) Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell. Biol.* **1**: 423-430.

Goopu, B., Chang, W.-S. W., Dafforn, T. R., Carrell, R. W., Read, R. J. (2000) Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**: 67-72.

Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Arora, N., Henderson, M.A., Leppla, S.H. (1995) Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect. Immun.* **63**: 82-87.

Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., Tweten, R.K. (1997) *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect. Immun.* **65**: 4130-4134.

Mock, M., Fouet, A., (2001) Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 647-671. Review.

Griffiths, G., Simons, K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science.* **234**: 438-443. Review.

Grigoryev, S. A., Bednar, J., Woodcock, C. I. (1999) MENT, a heterochromatin protein that mediates higher order chromatin folding, is a new serpin family member. *J. Biol. Chem.* **274**:5626-5636.

Gron, H., Meldal, M., and Breddam, K. 1992. Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry.* **31**: 6011-6018.

Gu, F., Crump, C.M., Thomas, G. (2001) Trans-Golgi network sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1067-1084. Review.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., Garten, W. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**: 358-361.

Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y. (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*. **293**: 1840-1842.

Heinz, F.X., Allison, S.L. (2001) The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 450-455. Review.

Hendy, G.N., Bennett, H.P., Gibbs, B.F., Lazure, C., Day, R., Seidah, N.G. (1995) Parathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin. A mass spectrometric study. *J. Biol. Chem.* **270**: 9517-9525.

Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., Than, M.E. (2003) The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 520-526. Erratum in: *Nat Struct Biol.* **10**: 669.

Hervé, M, Ghélis, C. (1991) Conformational stability of the covalent complex between elastase and alpha 1-proteinase inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**: 142-146.

Hood, D. B., Huntington, J. A., Gettins, P. G. W. (1994) Alpha 1-proteinase inhibitor variant T345R. Influence of P14 residue on substrate and inhibitory pathways. *Biochemistry.* **33**: 8538-8547.

Hopkins, P.C.R., Carrell, R.W., Stone, S.R. (1993) Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry.* **32**: 7650-7657.

Hopkins, P.C.R., Whisstock, J. (1994) Function of maspin. *Science.* **265**: 1893-1894.

Hopkins, P.C.R., Stone, S.R. (1995) The contribution of the conserved hinge region residues of alpha1-antitrypsin to its reaction with elastase. *Biochemistry.* **34**: 15872-15879.

Horimoto, T., Kawaoka, Y. (2001) Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 129-149. Review.

Horovitz, A. (1996) Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Fold. Des.* **1**: R121-R126.

Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., Nakayama, K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem.* **266**:12127-12130.

Hunt, L. T., Dayhoff, M. O. (1980) A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 864-71.

Huntington, J. A., Read, R. J., Carrell, R. W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* **407**: 923-926.

Huntington, J. A., McCoy, A., Pei, X. Y., Gettins, P. G. W., Carrell, R. W. (2000) The conformational activation of antithrombin. A 2.85-A structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions. *J. Biol. Chem.* **275**: 15377-15383.

Im, H., Ahn, H. Y., Yu, M.-H. (2000) Bypassing the kinetic trap of serpin protein folding by loop extension. *Protein Sci.* **9**: 1497-1502.

Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., Whisstock, J. C. (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* **10**: 1845-1864.

Irving, J. A., Steenbakkens, P. J., Lesk, A. M., Op den Camp, H. J., Pike, R. N., Whisstock, J. C. (2002) Serpins in prokaryotes. *Mol Biol Evol.* **19**:1881-90.

Isacson, O., Seo, H., Lin, L., Albeck, D., Granholm, A.C. (2002) Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh. *Trends Neurosci.* **25**: 79-84. Review.

Jackson, M.E., Simpson, J.C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L.M., Lord, J.M. (1999) The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* **112** : 467-475.

Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G., Lazure, C. (1995) Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J. Biol. Chem.* **270**, 19225-19231.

Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J., Thomas, G. (1998) α 1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 7293-7298.

Jernigan, J.A., Stephens, D.S., Ashford, D.A., Omenaca, C., Topiel, M.S., Galbraith, M., Tapper, M., Fisk, T.L., Zaki, S., Popovic, T., Meyer, R.F., Quinn, C.P., Harper, S.A., Fridkin, S.K., Sejvar, J.J., Shepard, C.W., McConnell, M., Guarner, J., Shieh, W.J., Malecki, J.M., Gerberding, J.L., Hughes, J.M., Perkins, B.A. (2001) Anthrax Bioterrorism Investigation Team. Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 933-944.

Jesty, J. (1979) The kinetics of formation and dissociation of the bovine thrombin-antithrombin III complex. *J. Biol. Chem.* **254**: 10044-10050.

Jiang, L., Rogers, J.C. (1999) Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. *Plant J.* **18**: 23-32.

Johanning, K., Juliano, M.A., Juliano, L., Lazure, C., Lamango, N.S., Steiner, D.F., Lindberg, I. (1998) Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *J Biol Chem.* **273**:22672-22680.

Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A., Thomas, G. (1995) Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* **14**: 5869-5883.

Jörnvall, H., Fish, W. W., Björk, I. (1979) The thrombin cleavage site in bovine antithrombin. *FEBS Lett.* **106**: 358-362.

Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*. **37**: 1075-1089.

Jung, L., Kreiner, T., Scheller, R.H. (1993) Expression of mutant ELH prohormones in AtT-20 cells: the relationship between prohormone processing and sorting. *J. Cell. Biol.* **121**: 11-21.

Kaslik, G., Patthy, A., Bálint, M., Gráf, L. (1995) Trypsin complexed with alpha 1-proteinase inhibitor has an increased structural flexibility. *FEBS Lett.* **370**: 179-183.

Kaslik, G., Kardos, J., Szabó, L., Závodsky, P., Westler, W. M., Markley, J. L., Gráf, L. (1997) Effects of serpin binding on the target proteinase: global stabilization, localized increased structural flexibility, and conserved hydrogen bonding at the active site. *Biochemistry*. **36**: 5455-5464.

Kayo, T., Sawada, Y., Suda, M., Konda, Y., Izumi, T., Tanaka, S., Shibata, H., Takeuchi, T. (1997) Proprotein-processing endoprotease furin controls growth of pancreatic beta-cells. *Diabetes* **48**: 1296-1304.

Kim, D., Yu, M.-H. (1996) Folding pathway of human alpha 1-antitrypsin: characterization of an intermediate that is active but prone to aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**: 378-384.

Kim, S.H., Creemers, J.W., Chu, S., Thinakaran, G., Sisodia, S.S. (2002) Proteolytic processing of familial British dementia-associated BRI variants: evidence for enhanced intracellular accumulation of amyloidogenic peptides. *J. Biol. Chem.* **277**: 1872-1877.

Kim, S.-J., Woo, J.-R., Seo, E. J., Yu, M.-H., Ryu, S.-E. (2001) A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved alpha(1)-antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops. *J. Mol. Biol.* **306**: 109-119.

Kinal, H., Park, C.M., Berry, J.O., Koltin, Y., Bruenn, J.A. (1995) Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell*. **7**: 677-688.

Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., Leppla, S.H. (1992) Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **89**: 10277-10281.

Koloczek, H., Banbula, A., Salvesen, G. S., Potempa, J. (1996) Serpin alpha 1proteinase inhibitor probed by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. *Protein Sci.* **5**: 2226-2235.

Komiyama, T., Grøn, H., Pemberton, P.A., Salvesen, G.S. (1996) Interaction of subtilisins with serpins. *Protein Sci.* **5**: 874-882.

Komiyama, T., Fuller, R.S. (2000) Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry*. **39**: 15156-15165.

Komiyama, T., VanderLugt, B., Fugere, M., Day, R., Kaufman, R.J., Fuller, R.S. (2003) Optimization of protease-inhibitor interactions by randomizing adventitious contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**:8205-8210.

Krysan, D.J., Rockwell, N.C., Fuller, R.S. (1999) Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J. Biol. Chem*. **274**: 23229-23234.

Lawrence, D.A., Ginsburg, D., Day, D.E., Berkenpas, M.B., Verhamme, I.M., Kvassman, J.-O., Shore, J.D. (1995) Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates. *J. Biol. Chem*. **270**: 25309-25312.

Lawrence, D.A. (1997) The serpin-protease complex revealed. *Nat. Struct. Biol*. **4**: 339-341.

Ledgerwood, E.C., Brennan, S.O., Birch, N.P., George, P.M. (1996) The specificity of the neuroendocrine convertase PC3 is determined by residues NH₂- and COOH-terminal to the cleavage site. *Biochem Mol Biol Int*. **39**:1167-1176.

Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A., Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* **267**:14304-14308.

Lee, K.N., Im, H., Kang, S. W., Yu, M.-H. (1998) Characterization of a human alpha1-antitrypsin variant that is as stable as ovalbumin. *J. Biol. Chem.* **273**: 2509-2516.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. **294**: 1945-1948.

Li, J., Wang, Z., Canagarajah, B., Jiang, H., Kanost, M., Goldsmith, E. J. (1999) The structure of active serpin 1K from *Manduca sexta*. *Structure Fold. Des.* **7**: 103-109.

Liu, G., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C.C., Hartwig, J.H., Thomas, G. (1997) Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J. Cell. Biol.* **139**: 1719-1733.

Löbermann, H., Tokuaka, R., Deisenhofer, J., Huber, R. (1984) Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J. Mol. Biol.* **177**: 531-557.

Lomas, D. A., Elliott, P. R., Chang, W.-S. W., Wardell, M. R., Carrell, R. W. (1995) Preparation and characterization of latent alpha 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.* **270**: 5282-5288.

Longas, M. O., Finlay, T. H. (1980) The covalent nature of the human antithrombin III--thrombin bond. *Biochem. J.* **189**: 481-489.

Lu, W., Zhang, W., Molloy, S.S., Thomas, G., Ryan, K., Chiang, Y., Anderson, S., Laskowski, M. Jr. (1993) Arg¹⁵-Lys¹⁷-Arg¹⁸ turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J. Biol. Chem.* **268**: 14583-14585.

Lukacs, C.M., Zhong, J.Q., Plotnick, M.I., Rubin, H., Cooperman, B.S., Christianson, D.W. (1996) Arginine substitutions in the hinge region of antichymotrypsin affect serpin beta-sheet rearrangement. *Nat. Struct. Biol.* **3**:888-893.

Luo, Y., Zhou, Y., Cooperman, B.S. (1999) Antichymotrypsin interaction with chymotrypsin. Intermediates on the way to inhibited complex formation. *J. Biol. Chem.* **274**: 17733-17741.

Mahloogi, H., Bassi, D.E., Klein-Szanto, A.J. (2002) Malignant conversion of non-tumorigenic murine skin keratinocytes overexpressing PACE4. *Carcinogenesis*. **23**: 565-72.

Matheson, N. R., van Halbeek, H., Travis, J. (1991) Evidence for a tetrahedral intermediate complex during serpin-proteinase interactions. *J. Biol. Chem.* **266**: 13489-13491.

Mellet, P., Boudier, C., Mely, Y., Bieth, J. G. (1998) Stopped flow fluorescence energy transfer measurement of the rate constants describing the reversible formation and the irreversible rearrangement of the elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 9119-9123.

Mikus, P., Urano, T., Liljeström, P., Ny, T. (1993) Plasminogen-activator inhibitor type 2 (PAI-2) is a spontaneously polymerising SERPIN. Biochemical characterisation of the recombinant intracellular and extracellular forms. *Eur. J. Biochem.* **218**:1071-1082.

Miller, S., Janin, J., Lesk, A.M., Chottia, C. (1987) Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **196**: 641-656.

Misumi, Y., Oda, K., Fujiwara, T., Takami, N., Tashiro, K., Ikehara, Y. (1991) Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3. *J. Biol. Chem.* **266**: 16954-165-959.

Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* **267**: 16396-16402.

Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* **267**: 16396-16402.

Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E., Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* **13**: 18-33.

Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F., Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell. Biol.* **9**: 28-35. Review.

Molloy, S.S., Thomas, G., *The enzymes*, 2000, 199.

Molloy, S.S., Thomas, G. in *The Enzymes*, Vol. XXII, 3rd ed.; Dalbey, R.E., Sigman, D.S., Eds; Academic Press: San Diego, 2001; p. 199.

Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R. M., Danley, D. E., Georghegan, K. F., Gerard, R. D., Goldsmith, E. J. (1992) Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature*. **355**: 270-273.

Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R. (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell*. **5**: 197-206.

Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G.N., Benjannet, S., Chretien, M., Seidah, N.G. (1997) In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J Biol Chem*. **272**:19672-19681. Erratum in: *J Biol Chem* **272**:30589.

Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J*. **327**: 625-635. Review.

Nash, P. McFadden, G., and Whitty, A. (2000) Application of linear free energy relationships to the serpin-proteinase inhibition mechanism. *FEBS Lett*. **475**: 1-6.

Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I., Kawaoka, Y. (2002) Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J. Virol*. **76**: 406-410.

Oda, K., Laskowski, M., Kress, L.F., Kowalski, D. (1977) Human plasma alpha1-proteinase inhibitor: temporary inhibition and multiple molecular forms of the complex with porcine trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**: 1062-1070.

Olson, S.T., Bock, P.E., Kvassman, J., Shore, J.D., Lawrence, D.A., Ginsburg, D., Björk, I. (1995) Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes. *J. Biol. Chem.* **270**: 30007-30017.

Olson, S.T., Swanson, R., Patston, P.A., Björk, I. (1997) Apparent formation of sodium dodecyl sulfate-stable complexes between serpins and 3,4-dichloroisocoumarin-inactivated proteinases is due to regeneration of active proteinase from the inactivated enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 13338-13342.

O'Reilly, M. S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W. S., Folkman, J. (1999) Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*. **285**: 1926-1928.

Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H., Carrell, R.W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N. Engl. J. Med.* **309**: 694-698.

Owen, M.C., George, P.M., Lane, D.A., Boswell, D.R. (1991) P1 variant antithrombins Glasgow (393 Arg to His) and Pescara (393 Arg to Pro) have increased heparin affinity and are resistant to catalytic cleavage by elastase. Implications for the heparin activation mechanism. *FEBS Lett.* **280**: 216-220.

Paquet, L., Zhou, A., Chang, E.Y., Mains, R.E. (1996) Peptide biosynthetic processing: distinguishing prohormone convertases PC1 and PC2. *Mol Cell Endocrinol.* **120**:161-168.

Patston, P. A., Gettins, P. G. W. (1996) Significance of secondary structure predictions on the reactive center loop region of serpins: a model for the folding of serpins into a metastable state. *FEBS Lett.* **383**: 87-92.

Pearce, M. C., Rubin, H., Bottomley, S. P. (2000) Conformational change and intermediates in the unfolding of alpha 1-antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **275**: 28513-28518.

Perona, J.J., and Craik, C.S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**: 337-360.

Peters, R.J., Shiau, A.K., Sohl, J.L., Anderson, D.E., Tang, G., Silen, J.L., Agard, D.A. (1998) Pro region C-terminus:protease active site interactions are critical in catalyzing the folding of alpha-lytic protease. *Biochemistry.* **37**: 12058-12067.

Peterson, F.C., Gettins, P. G. W. (2001) Insight into the mechanism of serpin-proteinase inhibition from 2D [^1H - ^{15}N] NMR studies of the 69 kDa alpha 1-proteinase inhibitor Pittsburgh-trypsin covalent complex. *Biochemistry*. **40**: 6284-6292.

Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelsbach, M., Dorner, F., Schlokot, U. (2001) 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochem J*. **354**:689-695.

Plotnick, M.I., Mayne, L., Schechter, N.M., Rubin, H. (1996) Distortion of the active site of chymotrypsin complexed with a serpin. *Biochemistry*. **35**: 7586-7590.

Plotnick, M.I., Samakur, M., Liu, X., Rubin, H., Schechter, N.M., Selwood, T. (2002) Heterogeneity in serpin-protease complexes as demonstrated by differences in the mechanism of complex breakdown. *Biochemistry*. **41**: 334-342.

Potempa, J., Fedak, D. Dubin, A., Mast, A., Travis, J. (1991) Proteolytic inactivation of alpha-1-anti-chymotrypsin. Sites of cleavage and generation of chemotactic activity. *J. Biol. Chem*. **266**: 21482-21487. Erratum in: *J. Biol. Chem*. **267**: 5016.

Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol*. **244**: 19-61.

Remold-O'Donnell, E. (1993) The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett.* **315**:105-8.

Rockwell, N.C., Fuller, R.S. (2002) Specific modulation of Kex2/furin family proteases by potassium. *J. Biol. Chem.* **277**: 17531-17537.

Rockwell, N.C., Krysan, D.J., Komiyama, T., Fuller, R.S. (2002) Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem. Rev.* **102**: 4525-4548. Review.

Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Bussemakers, M.J., van Heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F.M., Bloemers, H.P., Van de Ven, W.J. (1986) Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol. Biol. Rep.* **11**: 117-125.

Rott, R., Klenk, H.D., Nagai, Y., Tashiro, M. (1995) Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**: S16-S19. Review.

Sawada, Y., Suda, M., Yokoyama, H., Kanda, T., Sakamaki, T., Tanaka, S., Nagai, R., Abe, S., Takeuchi, T. (1997) Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J. Biol. Chem.* **272**: 20545-20554.

Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D., Garten, W. (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* 14: 2424-2435.

Schechter, N.M., Plotnick, M., Selwood, T., Walter, M., Rubin, H. (1997) Diverse effects of pH on the inhibition of human chymase by serpins. *J. Biol. Chem.* 272: 24499-24507.

Schiavo, G., van der Goot, F.G. (2001) The bacterial toxin toolkit. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 530-537. Review.

Schreuder, H. A., de Boer, B., Dijkema, R., Mulders, J., Theunissen, H. J. M., Grootenhuys, P. D. J., Hol, W. G. J. (1994) The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions. *Nat. Struct. Biol.* 1: 48-54.

Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., Chretien, M. (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* 9:789.

Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M., Chretien, M. (1991) Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol.* **5**:111-122.

Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., Chrétien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**: 9-24. Review.

Seidah, N.G. in *The Enzymes*, Vol. XXII, 3rd ed.; Dalbey, R.E., Sigman, D.S., Eds; Academic Press: San Diego, 2001; p. 237.

Sellman, B.R., Mourez, M., Collier, R.J. (2001) Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science.* **292**: 695-697.

Senzel, L., Huynh, P.D., Jakes, K.S., Collier, R.J., Finkelstein, A. (1998) The diphtheria toxin channel-forming T domain translocates its own NH₂-terminal region across planar bilayers. *J. Gen. Physiol.* **112**: 317-324.

Sherman, P.M., Lawrence, D.A., Yang, A.Y., Vanderberg, E.T., Paielli, D., Olsen, S.T., Shore, J.D., Ginsberg, D. (1992) Saturation mutagenesis of the plasminogen activator inhibitor-1 reactive center. *J. Biol. Chem.* **267**: 7588-7595.

Shimkets, L.J. (1999) Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 525-549. Review.

Shinde, U., Inouye, M. (1995) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: characterization of the structural changes in pro-subtilisin E coincident with autoprocessing. *J. Mol. Biol.* **252**: 25-30.

Siezen, R.J., Creemers, J.W., Van de Ven, W.J. (1994) Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *Eur. J. Biochem.* **222**: 255-266.

Siezen, R. J. (1996) Modelling and engineering of enzyme/substrate interactions in subtilisin-like enzymes of unknown 3-dimensional structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* **379**: 63-73.

Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., Whisstock, J. C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* **276**: 33293-33296.

Simonovic, M., Gettins, P. G. W., Volz, K. (2001) Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **98**: 11131-11135.

Smeekens, S.P., Steiner, D.F. (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. Biol. Chem.* **265**:2997-3000.

Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J., Steiner, D.F. (1991) Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:340-344.

Stavridi, E.S., O'Malley, K., Lukacs, C.M., Moore, W.T., Lambris, J.D., Christianson, D.W., Rubin, H., Cooperman, B.S. (1996) Structural change in alpha-chymotrypsin induced by complexation with alpha 1-antichymotrypsin as seen by enhanced sensitivity to proteolysis. *Biochemistry*. **35**: 10608-10615.

Stein, P. E., Leslie, A. G. W., Finch, J. T., Turnell, W. G., McLaughlin, P. J., Carrell, R. W. (1990) Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*. **347**: 99-102.

Stein, P. E., Chothia, C. (1991) Serpin tertiary structure transformation. *J. Mol. Biol.* **221**: 615-621. Review.

Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*. **157**: 697-700.

Steiner, D.F., Clark, J.L., Nolan, C., Rubenstein, AH, Margoliash, E., Aten, B., Oyer, P.E. (1969) Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *Recent Prog. Horm. Res.* **25**: 207-282. Review.

Steiner, D.F., Rouille, Y., Gong, Q., Martin, S., Carroll, R., Chan, S.J. (1996) The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* **22**:94-104. Review.

Steiner, D.F. in *The Enzymes*, Vol. XXII, 3rd ed.; Dalbey, R.E., Sigman, D.S., Eds; Academic Press: San Diego, 2001; p. 163.

Storrie, B., White, J., Rottger, S., Stelzer, E.H., Suganuma, T., Nilsson, T. (1998) Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J. Cell. Biol.* **143**: 1505-1521.

Stratikos, E., Gettins, P. G. W. (1997) Major proteinase movement upon stable serpin-proteinase complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 453-458.

Stratikos, E., Gettins, P.G.W. (1998) Mapping the serpin-proteinase complex using single cysteine variants of alpha1-proteinase inhibitor Pittsburgh. *J. Biol. Chem.* **273**: 15582-15589.

Stratikos, E., Gettins, P. G. W. (1998) Mapping the serpin-proteinase complex using single cysteine variants of alpha1-proteinase inhibitor Pittsburgh. *J. Biol. Chem.* **273**: 15582-15589.

Stratikos, E., Gettins, P. G. W. (1999) Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 4808-4813.

Takada, A., Kawaoka, Y. (2001) The pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Trends. Microbiol.* **9**: 506-511. Review.

Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K., Nakayama, K. (1995) Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **270**: 28397-28401.

Tangrea, M.A., Bryan, P.N., Sari, N., Orban, J. (2002) Solution structure of the pro-hormone convertase 1 pro-domain from *Mus musculus*. *J. Mol. Biol.* **320**: 801-812.

Thacker, C., Rose, A.M. (2000) A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays*. **22**: 545-553. Review.

Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R., Thorner, J. (1988) Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science*. **241**: 226-230.

Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**: 753-766.

Ueda, K., Lipkind, G.M., Zhou, A., Zhu, X., Kuznetsov, A., Philipson, L., Gardner, P., Zhang, C., Steiner, D.F. (2003) Mutational analysis of predicted interactions between the catalytic and P domains of prohormone convertase 3 (PC3/PC1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **100**: 5622-5627.

van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Keizer, G.D., Dorssers, L.C., Van de Ven, W.J. (1990) Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res.* **18**:664.

Vey, M., Schafer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk, H.D., Radsak, K. (1995) Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* **206**: 746-749.

Vidricaire, G., Denault, J.-B., Leduc, R. (1993) Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem Biophys Res Commun.* **195**:1011-1018.

Vindrola, O, Lindberg, I. (1993) Release of the prohormone convertase PC1 from AtT-20 cells. *Neuropeptides* **25**: 151-160.

Vischer, U.M., Wagner, D.D. (1994) von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood.* **83**: 3536-3544.

Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A., Klenk, H.D. (1998) Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 5762-5767.

Walker, J.A., Molloy, S.S., Thomas, G., Sakaguchi, T., Yoshida, T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1994) Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J. Virol.* **68**: 1213-1218.

Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., Haass, C. (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **276**: 14634-14641.

Walter, J., Kaether, C., Steiner, H., Haass, C. (2001) The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**: 585-590. Review.

Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L., Thomas, G. (1998) PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell.* **94**: 205-216.

Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., Reitz, A.B. (2000) beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **275**: 5626-5632.

Wang, Z. L., Mottonen, J., Goldsmith, E. J. (1996) Kinetically controlled folding of the serpin plasminogen activator inhibitor 1. *Biochemistry.* **35**: 16443-16448.

Warshel, A., Åqvist, J. (1991) Electrostatic energy and macromolecular function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**: 267-298. Review.

Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K., and Nakayama, K. (1992) Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 8270-8274.

Wedekind, J.E., Trame, C.B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T.M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R.J., McKay, D.B. (2001) Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J. Mol. Biol.* **314**: 823-837.

Wei, A., Rubin, H., Cooperman, B. S., Christianson, D. W. (1994) Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 251-258.

Whisstock, J., Lesk, A. M., Carrell, R. (1996) Modeling of serpin-protease complexes: antithrombin-thrombin, alpha 1-antitrypsin (358Met-->Arg)-thrombin, alpha 1-antitrypsin (358Met-->Arg)-trypsin, and antitrypsin-elastase. *Proteins.* **26**: 288-303.

Wilczynska, M., Fa, M., Karolin, J., Ohlsson, P.I., Johansson, L.B. et Ny, T. (1997) Structural insights into serpin-protease complexes reveal the inhibitory mechanism of serpins. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 354-357.

Wilmouth, R. C., Edman, K., Neutze, R., Wright, P. A., Clifton, I. J., Schneider, T. R., Schofield, C. J., Hajdu, J. (2001) X-ray snapshots of serine protease catalysis reveal a tetrahedral intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 689-694.

Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ, Kaufman RJ. (1990) Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 9378-9382.

Wright, H. T. (1984) Ovalbumin is an elastase substrate. *J. Biol. Chem.* **259**: 14335-14336.

Wright, H. T., Qian, H. X., Huber, R. (1990) Crystal structure of plakalbumin, a proteolytically nicked form of ovalbumin. Its relationship to the structure of cleaved alpha-1-proteinase inhibitor. *J. Mol. Biol.* **213**: 513-528.

Wright, H. T., Scarsdale, J.N. (1995) Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins.* **22**: 210-225.

Yabuta, Y., Takagi, H., Inouye, M., Shinde, U. (2001) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. *J. Biol. Chem.* **276**: 44427-44434.

Yamasaki, M., Arai, Y., Mikami, B., Hirose, M. (2002) Loop-inserted and thermostabilized structure of P1-P1' cleaved ovalbumin mutant R339T. *J. Mol. Biol.* **315**: 113-120.

Ye, S., Cech, A. L., Belmares, R., Bergstrom, R. C., Tong, Y., Corey, D. R., Kanost, M., Goldsmith, E. J. (2001) The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 979-983.

Zambon, M.C. (2001) The pathogenesis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.* **11**: 227-241. Review.

Zarkik, S., Decroly, E., Wattiez, R., Seidah, N.G., Burny, A., Ruysshaert, J.M. (1997) Comparative processing of bovine leukemia virus envelop glycoprotein gp72 by subtilisin/kexine-like mammalian convertases. *FEBS Lett.* **406**: 205-210.

Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J., Steiner, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* **273**: 11107-11114.